

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Cuantificación de Antioxidantes en Alimentos Naturales y
Artificiales**

**Monografía previa a la obtención del título de Licenciada en
Ciencias Químicas mención Química Analítica**

MICHELLE PAOLA SALINAS ARROYO

Quito, 2015

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Monografía de Licenciatura en Ciencias Químicas mención Química Analítica, de la Srta. Michelle Paola Salinas Arroyo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M. Sc. Eliza Jara Negrete
Directora de la monografía

Quito, 20 de marzo de 2015

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. DESARROLLO TEÓRICO	7
4.1 CONCEPTOS GENERALES	7
4.1.1 OXIDACIÓN CELULAR.....	7
4.1.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y ORIGEN DE ENFERMEDADES	7
4.1.3 RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL OXÍGENO (RLO).....	10
4.1.4 SISTEMA DE CONTENCIÓN DE RADICALES.....	12
4.1.5 ANTIOXIDANTES	14
4.1.6 BENEFICIOS EN LA SALUD DEBIDOS AL CONSUMO DE ANTIOXIDANTES.....	15
4.2 TIPOS DE ANTIOXIDANTES	18
4.2.1 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL PUNTO EN QUE ACTÚAN	19
ANTIOXIDANTES PRIMARIOS.....	20
ATRAPADORES DE OXÍGENO O SECUNDARIOS	20
ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	21
ANTIOXIDANTES QUELANTES.....	21
ANTIOXIDANTES MISCELÁNEOS.....	22
4.2.2 CLASIFICACIÓN POR SU ORIGEN	22
ANTIOXIDANTES NATURALES	23
ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS O ARTIFICIALES.....	24
4.3 PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS	26
4.3.1 PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS NATURALES.....	35
4.3.2 PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS PROCESADOS.....	36
4.4 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS	39
4.4.1 ESPECTROMETRÍA UV-VIS	40
4.4.2 CROMATOGRFÍA LÍQUIDA	43
4.4.3 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DIRECTA.....	49
DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).....	51
4.4.2 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN INDIRECTA	53

ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)	53
FRAP (capacidad antioxidante reductora de hierro)	54
5. CASOS DE ESTUDIO DE VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS.....	55
5.1 CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA A (RETINOL) EN AZÚCAR MORENO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA / VISIBLE, MÉTODO VALIDADO POR (Luna, 2013)	55
5.2 DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VITAMINA A EN MUESTRAS DE LECHE, MÉTODO VALIDADO POR (Araujo, y otros, 2013)	58
5.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN UCHUVA (uvilla) (Physalis peruviana L.) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION, DESARROLLADO POR (Gutierrez, Hoyos, & Páez, 2007)	63
5.4 DESARROLLO DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS, VALIDADO POR (Odorissi, Mercadante, Domingos, & Viotto, 2012).....	67
5.5 DETERMINACIÓN DE BETA-CAROTENO EN ACEITE DE PALMA POR HPLC CON DETECTOR UV, VALIDADO POR (Hernández, Aldana, & Rodríguez, 2011) 72	
5.6 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (ORAC _{FL}) DE PULPAS DE FRUTOS CONGELADOS, DETERMINADO POR (Kuskoski E. M., Asuero, Troncoso, & Fett, 2006) 77	
5.7 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE INGREDIENTES FUNCIONALES ANTIOXIDANTES, DESARROLLADA POR (Jiménez, 2007).....	80
6. DIFERENCIAS ENTRE MÉTODOS.....	90
6.1 MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS	90
6.2 HPLC y ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.....	92
7. CONCLUSIONES	94
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
9. ANEXOS.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de generación de radicales y efecto de antioxidantes.....	8
Figura 2 Formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno.....	12
Figura 3 Estructura de la Vitamina C.....	23
Figura 4 Estructura de la Vitamina A.....	23
Figura 5 Estructura de la Vitamina D2 (arriba) y D3 (abajo).....	24
Figura 6 Estructura del B-caroteno.....	24
Figura 7 Formula estructural de los Antioxidantes Sintéticos.....	25
Figura 8 Formula estructural de la vitamina E (α -tocoferol).....	26
Figura 9 Formas esteroisómeras del ácido ascórbico	28
Figura 10 Estructura química de los carotenos alfa, épsilon y zeta.....	29
Figura 11 Estructura química del licopeno	33
Figura 12: Capacidad antioxidante en alimentos determinada por el método ORAC. Fuente: (Lacalle, 2007)	35
Figura 13 Espectro electromagnético.....	40
Figura 14 Diseño de Espectrómetros de haz sencillo (A) y de doble haz (B)...	41
Figura 15 Diagrama de la estructura de un equipo de HPLC.....	43
Figura 16 Estrutura molecular del Trolox	49
Figura 17 Ejemplo de resultado que muestra la superposición de los espectros de radical ABTS*+ y antocianos disueltos en etanol.	51
Figura 18 Cromatograma de la muestra sin alteración.....	60
Figura 19 Cromatograma luego de degradaciones artificiales, (a) calentamiento a 80°C, (b) oxidación con agua oxigenada y (c) exposición a la luz solar indirecta por 60 días.....	60

Figura 20 Cromatograma del AA extraído de la uchuva, según el método	65
Figura 21 Cromatograma de la muestra de uvilla extraída por el método de ácido fosfórico.	65
Figura 23 Parametros utilizados para el cálculo de la estructura fina e intensidad de pico “cis” del espectro UV-VIS del carotenoide.	68
Figura 22 Curva de calibración β -caroteno – sistema y método	74
Figura 24 Fluorescencia relativa al blanco, de Trolox y de las muestras de pulpas congeladas.	78
Figura 25 Valores de ORAC esperados y experimentales para una solución acuosa de catequina: ácido gálico 5 μ M: 5 μ M (“sol pps”) mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.	88
Figura 26 Valores de ABTS esperados y experimentales en agua de una solución de catequina: ácido gálico 125 μ M: 125 μ M (“sol pps”) mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Radicales y compuestos oxidantes	10
Tabla 2 Fórmula química de los 4 tipos de tocoferoles	27
Tabla 3 Coeficiente de absorción específica usados para la cuantificación de carotenoides.....	31
Tabla 4 Colores amarillo, rojo y anaranjado de carotenoides comunes en alimentos.....	32
Tabla 5 Antioxidantes naturales presentes en alimentos de consumo regular. Fuente: (Causse, 2014) (Cubero, Monferrer, & Villalta, 2002) (Licopeno, 2015) (Calvo, 1991).....	36
Tabla 6 Aditivos permitidos actualmente en Ecuador.....	37
Tabla 7 Antioxidantes artificiales presentes en alimentos de consumo regular	38
Tabla 8 Características de los distintos tipos de columnas	46
Tabla 9 Tipos de detectores para HPLC.....	48
Tabla 10 Resultados analíticos, estadísticos e interpretación de resultados de los parámetros de desempeño.	57
Tabla 11 Valores promedio del contenido de Vitamina A, resultados expresados en mg/L	61
Tabla 12 Comparación de las marcas con la norma Covenin	61
Tabla 13 Resultados de la validación del método	62
Tabla 16 Resultados de la linealidad del método	69
Tabla 17 Recuperación de la luteína en las muestras de yogur con el agregado de colorante a base de luteína	69
Tabla 14 Precisión en la determinación de β -caroteno	75

Tabla 15 Resultados de β -caroteno en aceite y otros subproductos de Palma 76	
Tabla 18 Resultados de los métodos ORAC, ABTS, FRAP y DPPH en una mezcla de catequina: ácido gálico 1M: 1M en distintos disolventes.....	90
Tabla 19 Ventajas y desventajas de los métodos de determinación de capacidad antioxidante en alimentos.	91
Tabla 20 Datos comparativos entre HPLC y UV-VIS para la determinación de Vitamina A.....	92
Tabla 21 Datos comparativos entre HPLC y UV-VIS para la determinación de Carotenos.....	93

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Aditivos permitidos actualmente en Ecuador	102
Anexo 2 Aditivos permitidos en la Unión Europea.....	108
Anexo 3 Requerimientos de desempeño de los métodos de determinación directa	109

1. RESUMEN

El incremento de pacientes con enfermedades autoinmunes durante este último siglo, la búsqueda constante de la humanidad de alimentos naturales y suplementos alimenticios complementarios para la salud y nutrición, y el desarrollo de fuentes medicinales alternativas a las farmacéuticas tradicionales, ha llevado a varios científicos a realizar minuciosos experimentos sobre radicales libres y su perjuicio para la salud, el estrés oxidativo y la actividad de los antioxidantes como fuente nutricional y medicina preventiva. A pesar de que todavía existen muchas áreas sin investigar respecto a este tema, y que no se ha podido determinar una mínima ingesta diaria para la cura de ciertas enfermedades, las investigaciones actuales confirman la acción de los antioxidantes, especialmente los naturales, en la prevención de enfermedades autoinmunes y sus beneficios para la salud humana.

En esta monografía se efectúa un análisis comparativo de métodos para la determinación de antioxidantes naturales en alimentos, con el fin de establecer aquel que presenta mayores ventajas para su aplicación en laboratorios analíticos. Para ello, se realiza una revisión bibliográfica de los principales métodos que se emplean en la identificación de este tipo de compuestos y en la determinación de la capacidad antioxidante de sustancias individuales y mezclas. Adicionalmente, se describe brevemente el principio de las técnicas más importantes en este contexto. En base a la información obtenida, se recomienda para laboratorios de ensayo la implementación de métodos de

cromatografía líquida, HPLC, debido a la reproducibilidad, exactitud, selectividad y sensibilidad que ofrece en los casos reportados, además de permitir la cuantificación individual de varios compuestos en menos tiempo de análisis.

PALABRAS CLAVE: antioxidantes, capacidad antioxidante, cromatografía líquida, estrés oxidativo, radicales libres.

2. ABSTRACT

Three factors have led to current research about free radicals and their negative effect on human health: the rise on the frequency of autoimmune diseases during the last century, the increased use of alternative medicine products instead of traditional pharmaceutical drugs and, the quest on functional foods. Antioxidants have emerged as a nutritional source and preventive therapy for several diseases due to their efficiency to neutralize free radicals. Even though there are several aspects of antioxidant's action that have not yet been approached, scientific publications confirm that antioxidants have a beneficial effect on human health.

This monograph provides a comparative study on analytical methods for the determination of vitamins A, C, D and E in foodstuffs; these substances are important natural antioxidants. The main objective is to establish the method that offers more advantages for its implementation in an Analytical Laboratory. A bibliographic review was conducted to compile information regarding analytical methods for antioxidant identification, as well as for the estimation of antioxidant activity of individual compounds and mixtures. In addition, the working principle of main instrumental techniques is described. Based on the obtained information, it is advised to employ liquid chromatography methods, as these offer high reproducibility, accuracy, selectivity and sensitivity; besides, these methods require less time to perform an analysis and offer the chance to identify individual compounds.

KEYWORDS: antioxidants, carotenes, Liquid Chromatography, tocopherol, vitamins.

3. INTRODUCCIÓN

Los estudios desarrollados durante las primeras décadas del siglo veinte, relacionados con efectos nocivos de diferentes tipos de radiación, llevaron a los investigadores a determinar los efectos de los radicales libres, de manera específica el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), sobre la salud debido a que se verificó su responsabilidad sobre el daño celular isquémico (Tarrio, 2003). Desde ese momento, se consideraron los captadores de los radicales libres, denominados antioxidantes, como soluciones para los efectos descritos.

El organismo es incapaz de producir los antioxidantes, entre los que destacan la vitamina E, vitamina C, Beta-caroteno y Selenio que son componentes que aportan a reducir el envejecimiento celular y el deterioro general producido por el daño oxidativo. En este sentido, fue de sumo interés para los investigadores conocer las fuentes alimenticias de las cuales el cuerpo humano puede obtener los componentes antioxidantes y su capacidad, por lo que se desarrollaron varios métodos químicos de determinación.

En el presente estudio se identifica las técnicas de determinación de antioxidantes naturales y artificiales presentes tanto en alimentos naturales como procesados, con el fin de realizar un análisis comparativo de la eficiencia, sensibilidad, límites de cuantificación, límite de detección, y errores asociados al método de las diferentes técnicas analíticas de detección de antioxidantes en alimentos naturales y procesados.

Para lograr este objetivo general, se realizará una breve descripción de los compuestos con capacidad antioxidante además de una explicación de cómo

funcionan, los tipos de antioxidantes y sus efectos particulares en el organismo, los beneficios que aportan a la salud humana con el fin de justificar de manera adecuada el interés en el desarrollo de este trabajo.

Posteriormente, se revisan las diversas técnicas de determinación de antioxidantes y capacidad antioxidante en alimentos, para luego realizar un análisis comparativo de las técnicas descritas.

Al final del documento se muestran las conclusiones derivadas de la investigación bibliográfica realizada.

4. DESARROLLO TEÓRICO

4.1 CONCEPTOS GENERALES

4.1.1 OXIDACIÓN CELULAR

Para conocer qué es un antioxidante y la forma en que actúa, es importante comprender qué es, cómo se produce y qué efectos tiene la oxidación celular.

El proceso de oxidación celular se presenta cuando un átomo inestable pierde un electrón y forma un nuevo compuesto al combinarse con otro elemento; esto causa un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico para limpiar el organismo de sustancias nocivas. Aunque el oxígeno sirve para producir energía en el organismo, pequeñas porciones de este elemento producen radicales libres, que se forman de manera normal en el organismo al metabolizarlo (Ramírez, y otros, 2012).

4.1.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y ORIGEN DE ENFERMEDADES

En circunstancias normales, existe un equilibrio en el organismo entre las especies reactivas del oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante que se determinaron previamente. Sin embargo, el equilibrio puede verse alterado y se produce lo que se denomina “estrés oxidativo” que puede desencadenarse por radiación solar, respuestas inflamatorias e inmunológicas, déficit de vitaminas, alcoholismo, tabaquismo, entre otros (Saleem, 2008). Entonces se advierte la importancia de los antioxidantes al colaborar para retomar el equilibrio Redox como lo muestra la figura 1 que detalla el proceso de generación de radicales y la acción del antioxidante:

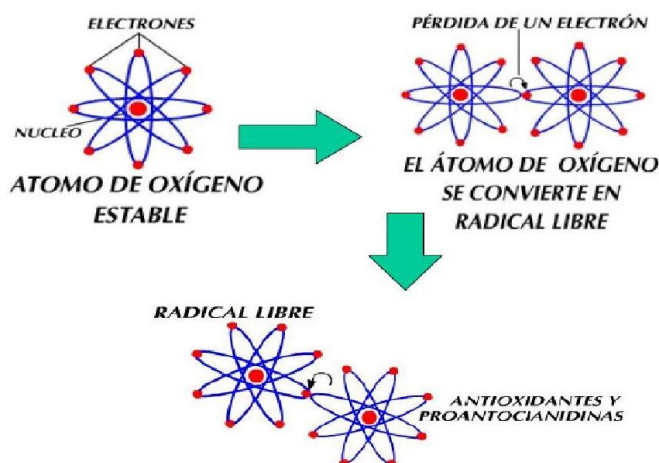


Figura 1 Ciclo de generación de radicales y efecto de antioxidantes

Fuente: (HUIVH, 2010)

La producción de radicales libres en el organismo, como se ha dicho, puede aumentar descontroladamente frente a la producción del sistema de defensa; a esta situación se la conoce con el nombre de estrés oxidativo. En este escenario se presenta un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales (Desmarchelier & Ciccía, 1998).

Se ha verificado, a través de varios estudios, que existe una relación causal entre la presencia de estrés oxidativo y el desarrollo de algunas patologías. Se puede mencionar, como ejemplo de esto, que en las células fagocitarias del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) se producen grandes cantidades de radicales como parte del mecanismo que les permite destruir agentes patógenos. Aunque esto constituye una defensa esencial contra la infección, hay enfermedades tales como la artritis reumatoide que se produce

por exceso de activación fagocitaria y el consecuente daño que provoca en los tejidos (Desmarchelier & Ciccia, 1998).

Los radicales pueden dañar moléculas biológicas como proteínas, lípidos y ADN (Seema Bhagwat, 2011) y causan inflamación en las células conduciendo a una variedad de problemas de salud y enfermedades cardiovasculares (AHA Science Advisory, 1999). Investigaciones epidemiológicas han reportado que el estrés oxidativo inicia una serie de condiciones patológicas (hipertensión y arterioesclerosis) que afectan directamente las paredes de las células vasculares (Furukawa S, 2004).

La fuente principal de radicales dentro de la célula es la mitocondria, sin embargo también se producen a nivel de las peroxisomas y los leucocitos polimorfonucleares, especialmente durante procesos inflamatorios, en los cuales la coenzima NADPH oxidasa (generadora de oxígeno molecular (O_2)), en presencia de hierro (Fe) genera radicales hidroxilo ($OH\cdot$) (Criado & Moya, 2009).

La producción de radicales es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis; a pesar de estar en debate, actualmente estos postulados se encuentran vigentes (Gilca, Stoian, & Virgolici, 2007). El organismo necesita consumir antioxidantes, porque su sistema de protección es insuficiente dentro de un cuadro de estrés oxidativo. Los antioxidantes más conocidos son: vitamina C, vitamina E, Beta-caroteno y Selenio (mineral); estos antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los radicales y/o especies reactivas, por lo que aportan a un sistema de prevención, mientras otros inhiben la acción de los radicales, lo que se denomina

sistema barredor; y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas, lo que se conoce como sistema de reparación.

4.1.3 RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL OXÍGENO (RLO)

Con el fin de profundizar en el estudio de los antioxidantes y las técnicas de medición de capacidad anti oxidativa, es importante comprender qué son los radicales libres derivados del oxígeno. La tabla 1 muestra un resumen de los radicales y compuestos derivados de oxígeno que actúan como compuestos oxidantes dentro del organismo.

Tabla 1 Radicales y compuestos oxidantes

Fuente: (Lacalle, 2007)

RADICALES		COMPUESTOS OXIDANTES	
Dióxido de nitrógeno	NO ₂	ácido Hipobromoso	HBrO
Alcoxilo	RO	Ozono	O ₃
Óxido Nítrico	NO	Alquil peroxinitritos	ROONO
Superóxido	O ₂	Catión Nitrilo	NO ²⁺
Hidroperoxilo	HOO	Ácido Nitroso	HNO ₂
Peroxilo	ROO	Ácido Hipocloroso	HClO
Hidroxilo	OH	Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
		Oxígeno	O ₂
		Peróxidos orgánicos	ROOH

La historia de los estudios sobre RLO y sus efectos en el organismo es relativamente reciente. Durante la primera mitad del siglo XX se realizaron estudios sobre los efectos de las radiaciones X y gamma en el cuerpo humano y llegaron a indicar que los radicales, específicamente el hidroxilo, eran los responsables del daño celular (Sanz & RK., 2008).

Los radicales se producen en varios órganos del cuerpo humano como resultado de actividades fisiológicas y químicas normales y, a pesar de su reputación como elementos negativos para la salud, tienen algunas funciones importantes, como coadyuvar a combatir una infección. No obstante, los radicales libres pueden causar efectos nocivos a tejidos sanos y se investiga su papel en el desarrollo de varias enfermedades.

Los potenciales efectos dañinos de los radicales libres excesivos oscilan entre los de tipo dermatológico a mortales. Dichos radicales pueden romper el tejido de la piel, haciendo que esta luzca más vieja con arrugas prematuras y/o manchas visibles. Pueden lesionar el cristalino de los ojos, hecho que acelera el desarrollo de cataratas. Y quizás dificulte que las células se reparen a sí mismas, incrementando el riesgo de cáncer, cardiopatía y otras enfermedades relacionadas con la edad (Bratman, 2011).

En concentraciones altas, los radicales libres pueden ser peligrosos para el organismo y pueden dañar los componentes principales de la célula, como el ADN, las proteínas y las membranas celulares. Se cree que el daño causado por los radicales libres a las células, especialmente al ADN, está asociado con el desarrollo de varias enfermedades incluyendo el cáncer. (Gilca, Stoian, & Virgolici, 2007).

El término “radicales libres del oxígeno” o especies reactivas del oxígeno (RLO) engloba no solamente a los verdaderos radicales derivados del oxígeno, como el superóxido ($O_2^{\cdot -}$) o el hidroxilo (OH^{\cdot}) sino que en él se incluyen además moléculas no radicales como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozono (O_3), etc. Bajo el punto de vista químico tanto el $O_2^{\cdot -}$ como el H_2O_2 no son muy reactivos frente a

la mayoría de las biomoléculas en soluciones acuosas y en condiciones fisiológicas (aunque lo son bastante más que el O_2) si las comparamos con la actividad del radical OH^\cdot , el problema que plantean aquellos es que, en determinadas circunstancias del entorno celular, se transforman en radicales hidroxilo. Otro aspecto a tener en cuenta es la capacidad del H_2O_2 para difundir a través de la bicapa lipídica, lo que hace posible su presencia por difusión en diferentes compartimentos celulares. Esta circunstancia aumenta las probabilidades de que el H_2O_2 pueda reaccionar con átomos de Fe^{++} celular produciendo radicales hidroxilo (Universidad de Cantabria, 2014).

A manera de ejemplo, en la figura 2, se presenta el proceso de formación de radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno en presencia de radiación ultra violeta.

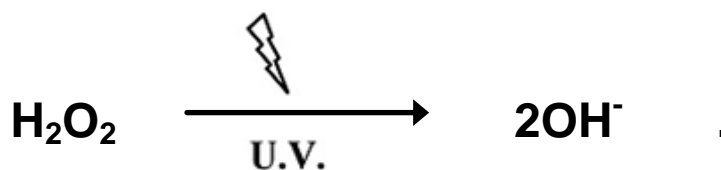


Figura 2 Formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno.

4.1.4 SISTEMA DE CONTENCIÓN DE RADICALES

El cuerpo humano, por sí solo, tiene todo un sistema desarrollado para contener los radicales y, por ende, protegerse de sus efectos. Los seres vivos cuentan con una serie de mecanismos que lo defienden en contra la oxidación química y las radiaciones, los cuales son mecanismos de detoxificación enzimática o moléculas más pequeñas, los antioxidantes, que captan los radicales. Los sistemas de defensa antioxidante protegen el organismo en un

estado de equilibrio Redox; sin embargo, estos sistemas de defensa pueden ser insuficientes o estar sobrecargados por la acción de agentes externos o procesos patológicos, por lo cual, contar con fuentes externas de antioxidantes permite volver a un estado de equilibrio. Es por ello que se ha considerado que los agentes antioxidantes exógenos deberían ayudar al organismo a resguardarse o a tener una vida más duradera (Moure:, 2010). En este sentido, se pudo determinar que el consumo elevado de ciertos nutrientes que contengan antioxidantes puede mejorar este sistema y por lo tanto mejorar la salud.

De la manera señalada se pudo determinar que los captadores de radicales libres actúan como solución al daño producido por la oxidación, relacionado con las radiaciones y con otros procesos biológicos de deterioro que es causada por los mismos radicales. Se inició entonces con una teoría que explicaba el envejecimiento y deterioro celular por la acción de los radicales, entonces denominados “libres” y su solución podría provenir de los antioxidantes captadores de dichos radicales. Esta teoría aún subsiste aunque no se ha dejado de debatir (Sanz & RK., 2008).

Los radicales también son sustancias químicas muy reactivas que tienen como efecto la introducción de oxígeno en las células, produciendo oxidación de las diversas partes de la célula, además de determinadas alteraciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y cambios que se manifiestan en el deterioro del cuerpo y envejecimiento. Cabe señalar que el propio organismo es el que genera radicales para funciones como la eliminación de bacterias o la regulación de la actividad de los órganos; pero también el organismo, genera antioxidantes para eliminar los radicales libres sobrantes, porque estas sustancias son muy agresivas (Sanz & RK., 2008).

4.1.5 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una molécula o compuesto, capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Se encuentran definidos por la Administración de Alimentos y Medicinas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) como conservadores alimenticios que retardan específicamente el deterioro, rancidez, o decoloración, por su oxidación lipídica (Kamal, 1996).

Adicionalmente, los antioxidantes tienen aplicaciones industriales como conservantes de productos cosméticos y de limpieza, y la prevención de la degradación del caucho y la gasolina, ya que impiden el deterioro causado por contacto con el oxígeno del aire (Galárraga, 2003).

En el organismo, hacen el papel de elemento protector en contra de los efectos dañinos de los radicales libres, los cuales reaccionan químicamente con otros componentes de las células (oxidándolos) alterando su estabilidad y funcionalidad, generando reacciones en cadena que pueden dañar las células.

Los antioxidantes neutralizan a los radicales libres e inhiben otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos, lo cual convierte a los antioxidantes en agentes reductores.

Los antioxidantes existentes en el cuerpo sirven para prevenir daño a los tejidos. El ejercicio aumenta la generación de catecolaminas, que por auto-oxidación producen radicales libres, lo cual puede dañar el músculo causando inflamación y liberación de superóxido. Un mayor consumo de alimentos ricos en vitamina E o suplementos nutricionales que la contengan, mejoran la tolerancia a la glucosa, incrementando la acción de la insulina, aumentan los niveles de

lipoproteínas e intensifican la reparación del músculo del daño ocasionado durante el ejercicio (Murgio, 2005).

4.1.6 BENEFICIOS EN LA SALUD DEBIDOS AL CONSUMO DE ANTIOXIDANTES

Una vez que se ha revisado, a breves rasgos, qué son los antioxidantes y la forma en que actúan en el organismo, es necesario identificar los beneficios que, según varios estudios, acarrea el consumo de alimentos ricos en estos elementos.

Varios estudios sugieren que el consumo de antioxidantes aporta, de manera directa o indirecta, a la prevención y el tratamiento de diversas patologías.

Por estudios clínicos, se ha planteado que los antioxidantes juegan un papel de importancia en el tratamiento de patologías cardiovasculares, en diversos tipos de cáncer, incluso en el tratamiento del SIDA en síntomas asociados con el proceso de envejecimiento, como alteraciones del sistema nervioso o la presencia de cataratas (Meyer, Galon, Douville, & al., 2007).

De manera particular, los estudios se han centrado principalmente en analizar los beneficios de la vitamina C, vitamina E, beta- carotenos, flavonoides, selenio y zinc. La relación entre estos antioxidantes y las enfermedades cardiovasculares y, probablemente, las cerebrovasculares, está hoy suficientemente demostrada (Meyer, Galon, Douville, & al., 2007).

Los antioxidantes se pueden encontrar en diversos alimentos naturales y procesados o adicionados; las fuentes naturales incluyen las frutas y verduras que

pueden contener retinoides, licopeno, oligoelementos y vitaminas C y E. Algunos estudios revelan que estos elementos tienen capacidad, para revertir lesiones precancerosas, y actuar sobre la aparición del cáncer oral (González, 2008).

Otra fuente importante de antioxidantes ha sido determinada en el grupo de semillas que han resultado efectivas para proveer protección contra la acción de los radicales y la oxidación de lípidos inducida por los radicales; así mismo, se ha determinado la importancia de esta fuente contra el daño al ADN (Bagchi, y otros, 2000). Es así que el extracto de semillas de vid se ha comprobado que disminuye significativamente el dolor en pacientes con pancreatitis crónica, asociado con una marcada reducción de los niveles de marcadores bioquímicos del estrés oxidativo (Bhaskar Banerjee, 2001).

Las frutas en general, específicamente las frutas pequeñas y frutos rojos, contienen una amplia diversidad de flavonoides y ácidos fenólicos que han demostrado tener actividad antioxidante. Los estudios realizados sobre la actividad antioxidante de las frutas pequeñas han sido enfocados principalmente en uvas, en las cuales se han reportado que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad humanas (LDL) en un nivel comparable con el del vino. (Ruidavets, y otros, 2000) Por otra parte, el extracto de frutillas frescas actúa como un antioxidante 5 veces más activo que el Trolox. El Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol o vitamina E, empleado en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo. Por su alta solubilidad en agua, es usualmente empleado como estándar para desarrollo de curvas de calibración en análisis de actividad antioxidante (Mesa-Vanegas A. M., y otros, 2009).

Los extractos de moras, arándanos rojos y negros, mortiños, frambuesas negras y rojas poseen una alta actividad como captadores de radicales superóxido (Kähkönen, y otros, 1999).

Los aceites de algas producidos por tecnologías de fermentación tienen muchos beneficios como alimentos funcionales por su contenido de ácidos grasos de alto peso molecular, entre los que se destacan los omegas 3, 6 y 9. El extracto de semillas de uva agregado a una emulsión de aceite de algas estabilizada con proteínas aisladas de suero de leche inhibió la formación de propanal y de lípidos hidroxiperóxidos a pH 3 y a pH 7 (Min Hu & Decker, 2004).

Otro beneficio proviene del consumo del tomate de árbol y sus derivados, ya que se ha demostrado que puede reducir el nivel de colesterol total en el cuerpo y el nivel de LDL (lipoproteínas de baja densidad); aparte, permite aumentar el nivel de HDL (lipoproteínas de alta densidad) con menor efecto sobre los triglicéridos. Los derivados del tomate han mostrado su capacidad de inhibir la oxidación de la LDL, lo que probablemente se deba a su contenido de moléculas antioxidantes (Palomo, Fuentes, & Moore, 2010).

Dos componentes alimentarios que resultan substanciales para la inhibición del potencial de oxidación del colesterol son: la concentración de ácido linoléico y la disponibilidad de antioxidantes (siendo la vitamina E el nutriente más importante). Este es el antioxidante más concentrado que se encuentra en las LDL, en una cantidad 20 a 300 veces mayor que cualquier otro antioxidante (Kwiterovich, 1997). Se ha demostrado que la vitamina E induce la muerte celular en células del cáncer colo-rectal y aumenta la inhibición del crecimiento de éstas

células por el fluorouracilo, lo que se sugiere como tratamiento complementario para éste tipo de cáncer (Norman, Butrum, & Feldman, 2003).

Varios estudios sugieren que la vitamina C, en su acción antioxidante contra el estrés oxidativo de la mucosa gástrica en la enfermedad ocasionada por *Helicobacter pylori*, atrapa y neutraliza una variedad de especies reactivas del oxígeno, como hidroxilo, alcoxilo, peroxilo, anión superóxido, radicales hidroperóxilo y radicales reactivos del nitrógeno a concentraciones muy altas (Zhang & Farthing, 2005).

En pancreatitis aguda, se observó la participación de los radicales libres en esta enfermedad. Se estudiaron las concentraciones de selenio, vitamina A y vitamina C en pacientes con este padecimiento y se encontró que presentaban valores muy bajos para estos micronutrientes (Musil, Zadák, & Solichová, 2005).

4.2 TIPOS DE ANTIOXIDANTES

En el organismo existen antioxidantes endógenos que evitan las reacciones en cadena que generan los radicales libres. Se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- Sistemas enzimáticos capaces de inhibir a los ROS. Superóxido dismutasa (SOD), que elimina el anión superóxido mediante su conversión a peróxido de hidrógeno. Las células humanas poseen una enzima SOD en la mitocondria con manganeso en su centro activo, y una enzima SOD con zinc y cobre en su centro activo, presente en mayor cantidad en el citosol.

- Enzimas capaces de descomponer ciertos intermediarios de la oxidación no radicálicos.
- Catalasas presentes en los peroxisomas, que transforman el peróxido de hidrógeno en agua (H_2O) y oxígeno (O_2).
- Glutation peroxidasa (GSHPX), que requiere selenio en su centro activo y que elimina el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos, transformando el glutatión reducido o GSH en glutatión oxidado o GSSG.
- Glutation reductasa, que regenera el GSH desde el GSSG, con NADPH como fuente de poder reductor. La actividad de las enzimas antioxidantes en el hígado se reduce como consecuencia de situaciones que aumenten el estrés oxidativo, como el alcohol, y se ha visto incrementada fruto de la ingesta de polifenoles, aunque los resultados en este sentido no han sido concluyentes.
- Sistemas no enzimáticos, como ciertas moléculas capaces de quelar metales – transferrina, lactoferrina, hemopoxina, ceruloplasmina, etc.

4.2.1 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL PUNTO EN QUE ACTÚAN

Según el punto en el que actúan en el proceso de oxidación, hay 5 tipos de antioxidantes generalmente aceptados: antioxidantes primarios, atrapadores de oxígeno o sinergistas (antioxidantes secundarios), antioxidantes enzimáticos (biológicos), agentes quelantes o secuestrantes y misceláneos.

ANTIOXIDANTES PRIMARIOS

Son compuestos que actúan neutralizando los radicales libres. Dentro de los principales antioxidantes de este grupo se encuentran: el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y la ter- butilhidroxiquinona (TBHQ) (Furukawa S, 2004).

Los antioxidantes primarios retrasan la oxidación reaccionando con un radical libre, o inhiben la fase de propagación por reacción con radicales libres y les convierten en compuestos más estables donando electrones o hidrógenos.

Pueden reaccionar con los radicales lipídicos para formar complejos lipídicos-antioxidantes.

El antioxidante actúa como donador de hidrógeno a un radical libre R^* o ROO^* inactivándolo, pues finaliza la reacción en cadena neutralizando su actividad.

Cuando se mezclan entre sí algunos antioxidantes primarios pueden tener una actividad sinérgica mayor a la suma de sus efectos individuales (Kamal, 1996).

ATRAPADORES DE OXÍGENO O SECUNDARIOS

Son compuestos que remueven el oxígeno de los sistemas cerrados. Se los conoce como antioxidantes secundarios ya que a parte de su acción antioxidante, cumplen también otras funciones. El dióxido de azufre y

sulfitos, así como la lecitina son antioxidantes secundarios y se los emplea como decolorantes, estabilizadores de acidez o conservantes (INEN, 2013).

Algunos atrapadores de oxígeno pueden fortalecer la acción de los antioxidantes primarios. El ácido láctico y lactatos, ácido cítrico y citratos, ácido tartárico y tartratos, etc. actúan como catalizadores en las reacciones de auto-oxidación de metales complejos (Butnariu & Grozea, 2012). El ácido ascórbico y sus derivados actúan como sinergistas en la regeneración de los antioxidantes primarios (Gilca, Stoian, & Virgolici, 2007).

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Incluyen varias enzimas como a la glucosa oxidasa, el superóxido dismutasa, la catalasa y la glutathione peroxidasa. Estos remueven el oxígeno de los compuestos altamente reactivos. Los agentes quelantes son compuestos secuestrantes de iones de complejos metálicos (cobre y hierro) que catalizan la oxidación lipídica. El ácido etilendiamintetracético (EDTA), el ácido cítrico, los compuestos fenólicos de las plantas y los aminoácidos son quizás los mejores compuestos de esta clasificación. También estos compuestos se clasifican frecuentemente como sinergistas (Blasar, 2010).

ANTIOXIDANTES QUELANTES

También se denominan a veces sinérgicos de antioxidantes, que tienen acción antioxidante por medio del mecanismo del secuestro de las trazas de metales presentes en el alimento, como por ejemplo: cobre y hierro, que pueden encontrarse en el alimento de forma natural o incorporárseles

durante el proceso industrial, y son eficaces como aceleradores de las reacciones de oxidación.

Algunos de estos aditivos pueden servir como acidificantes o conservantes, en cambio otros aditivos tienen como principal función una actividad antioxidante por este mecanismo, como por ejemplo, los fosfatos, el sorbitol, etc.

ANTIOXIDANTES MISCELÁNEOS.

Se incluyen a materiales de plantas y animales que han sido estudiados como antioxidantes en aceites de origen vegetal como de la semilla de la soya, palma, arroz, olivo, algodón, maní y germen de trigo. Varios hidrolizados de proteínas y aminoácidos son potentes antioxidantes. Algunos flavonoides y derivados del ácido cinámico, ácido caféico y el ácido clorogénico han mostrado una fuerte actividad antioxidante (Furukawa S, 2004).

4.2.2 CLASIFICACIÓN POR SU ORIGEN

Otra de las formas de clasificar los antioxidantes es por su origen, siendo: naturales, y sintéticos. Algunos antioxidantes naturales como el ácido ascórbico y el α tocoferol se obtienen naturalmente, pero también por síntesis química.

ANTIOXIDANTES NATURALES

Algunos de los antioxidantes naturales, se encuentran en plantas con estructura química básica de C_6H_5-COOH o ácido benzoico, y de $C_9H_8O_2$ o ácido cinámico.

Existen enzimas antioxidantes como: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX), y la catalasa.

Los principales antioxidantes no enzimáticos son el glutatión (GSH), el ácido α -lipóico, los carotenoides, la bilirrubina, la vitamina C, la vitamina E y la ubiquinona (Murgio, 2005).

Las figuras 3, 4, 5 y 6 muestran la estructura química de la Vitamina A, C, E, beta-caroteno y licopeno, siendo estos los antioxidantes más comunes y abundantes en una dieta balanceada.

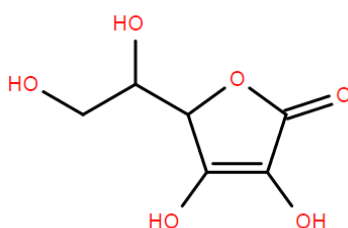


Figura 3 Estructura de la Vitamina C

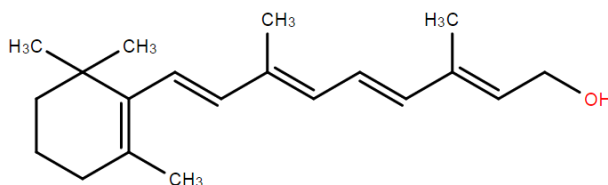


Figura 4 Estructura de la Vitamina A

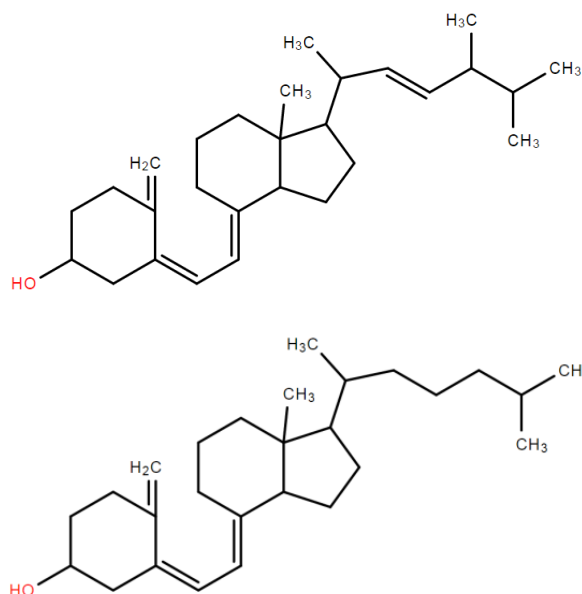


Figura 5 Estructura de la Vitamina D2 (arriba) y D3 (abajo)

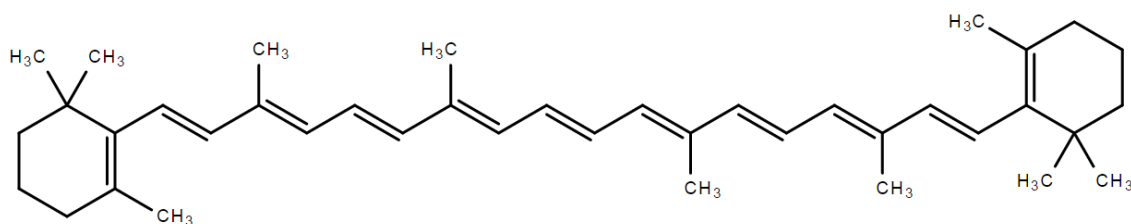


Figura 6 Estructura del B-caroteno

ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS O ARTIFICIALES

Los antioxidantes sintéticos son donadores de protones. El BHA, (2-tert-butil-4-hidroxianisol y 3-tert-butil-4-hidroxianisol), el BHT (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol), la THBP (2,4,5-tri-hidroxibutil fenona), el 4-hidroximetil-2,6-ditertbutilfenol, la TBHQ (2-(1,1-Dimetil-etil)-1,4-benzenodiol) y los galatos no detienen la formación de los radicales, por el contrario reaccionan con ellos y son consumidos durante la reacción, lo cual estabiliza los compuestos y produce radicales del antioxidante con menor actividad. (Ornelas, 2011) En la Figura 7 se detalla su estructura molecular.

Los antioxidantes sintéticos que actualmente permite usar la Unión Europea son: Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Galatos de butilo, propilo o dodecilo.

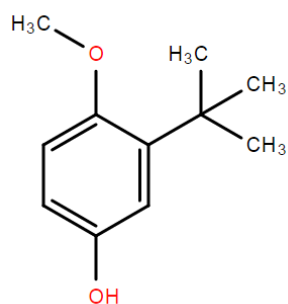
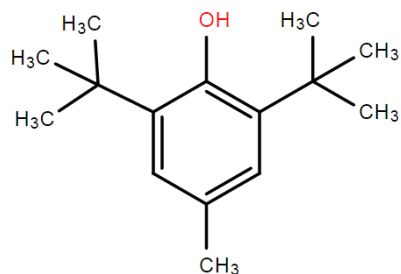
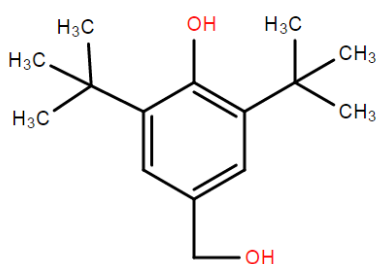
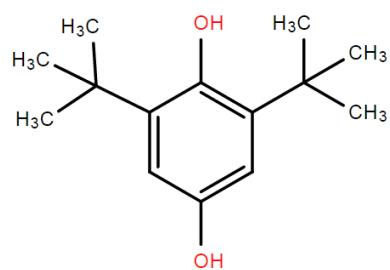
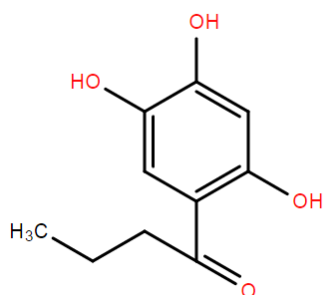
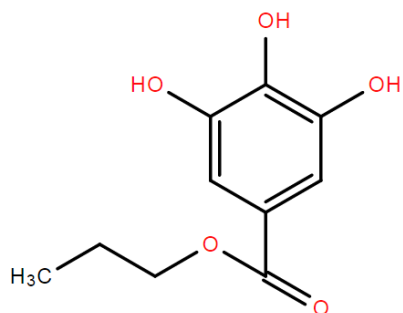
**BHA****BHT****TBHQ****4-hidroximetil-2,6-ditertbutilfenol****THBP****n-Propilo 3,4,5 Trihidroxi Benzoato**

Figura 7 Formula estructural de los Antioxidantes Sintéticos

4.3 PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS

La mayoría de antioxidantes están presentes en alimentos de origen vegetal. Por lo tanto, de acuerdo a lo descrito en este trabajo, una dieta rica en frutas, legumbres, verduras y hortalizas o cereales integrales, sería muy beneficioso para nuestra salud.

Los principales antioxidantes presentes en alimentos son:

- **VITAMINA E.-** También conocida como tocoferol es una vitamina liposoluble, cuya fórmula se muestra en la figura 8.

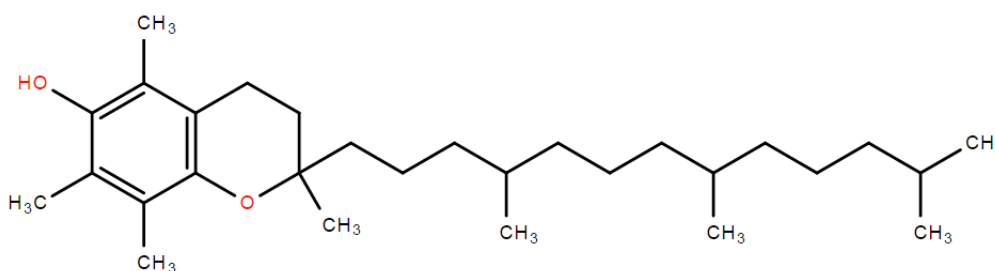


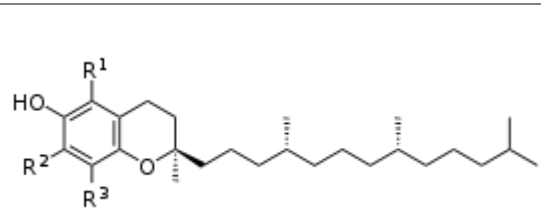
Figura 8 Formula estructural de la vitamina E (α-tocoferol)

La vitamina E en estado natural tiene ocho diferentes formas de isómeros, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos los isómeros tienen un anillo cromanol con un hidroxilo que puede donar un átomo de hidrógeno para reducir radicales libres y una cadena lateral hidrofóbica que permite la penetración en membranas biológicas. La tabla 2 muestra los diferentes tipos de tocoferoles y su estructura química.

Considerada como la primera línea de defensa contra el daño en la membrana de las células, ocasionado por la oxidación. Es liposoluble, lo cual favorece su efectividad ya que las membranas celulares están formadas por lípidos, penetra en las membranas y elimina los radicales libres.

Tabla 2 Fórmula química de los 4 tipos de tocoferoles

Fuente: (Tocoferoles, 2014)

Tocoferoles	R ¹	R ²	R ³	Nombre
	<u>CH₃</u>	<u>CH₃</u>	<u>CH₃</u>	α-tocoferol
	<u>CH₃</u>	<u>H</u>	<u>CH₃</u>	β-tocoferol
	<u>H</u>	<u>CH₃</u>	<u>CH₃</u>	γ-tocoferol
	<u>H</u>	<u>H</u>	<u>CH₃</u>	δ-tocoferol

El alfa tocoferol es la forma más común y activa, ayuda a prevenir o retrasar enfermedades coronarias limitando la oxidación del LDL (colesterol malo) y además previene la formación de los coágulos en la sangre. Bloquea la formación de las nitrosaminas (agentes cancerígenos), las cuales se forman en el estómago por la degradación de los nitritos.

Está presente en: germen de trigo, aceite de soya, germen de cereales, cereales de grano entero, aceite de oliva, vegetales de hoja verde y frutos secos (Causse, 2014) (Cubero, Monferrer, & Villalta, 2002).

- **VITAMINA C.-** es el enantiómero L (levógiro) del ácido ascórbico. Ácido orgánico hidrosoluble que se presenta en forma de cristales incoloros, es inodoro y presenta un sabor ácido. En organismos vivos, es un cofactor en varias reacciones enzimáticas vitales. Su estructura química se representa en la figura 3.

El ácido ascórbico existe en cuatro formas estereoisómeras diferentes que muestran actividad óptica, las cuales se describen en la figura 9.

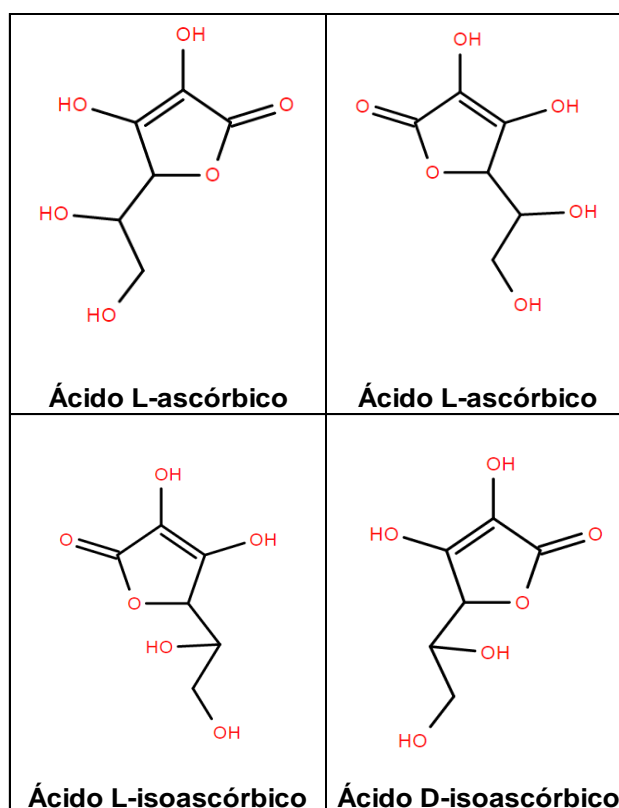


Figura 9 Formas esteroisómeras del ácido ascórbico

El ácido L-ascórbico y el D-isoascórbico son epímeros, es decir que se distinguen sólo en la configuración de uno de los átomos de carbono. A pesar de estas pequeñas diferencias, los estereoisómeros del ácido ascórbico son inactivos en el organismo, dado que las enzimas reconocen específicamente al L-ascórbico (Perez, 2014).

La vitamina C realiza más de 300 funciones dentro del organismo humano. Es requerida para producir colágeno, elimina radicales libres, es el antioxidante más importante en el organismo. Su hidrosolubilidad le permite ingresar al interior de la célula y ser distribuida en el organismo por el torrente sanguíneo.

Está presente en: naranja, limón, mandarina, toronja y frutos cítricos en general (Causse, 2014) (Cubero, Monferrer, & Villalta, 2002).

• **CAROTENOS.-** molécula hidrosoluble de la familia de los terpenoides (terpenos modificados donde grupos metilo han sido reemplazados por átomos de oxígeno) formados por cadenas de cuarenta carbonos. Tienen estructura isoprenoide, es decir un número variable de dobles enlaces conjugados y también pueden presentar anillos, esto les proporciona absorancias a diferentes longitudes de onda, las cuales van de 380 hasta 500 nm dentro del espectro de luz visible. Su estructura define el color del compuesto que va desde verde (zeta-caroteno), amarillo (beta-caroteno), naranja (neurosporaxantina), hasta el rojo (licopeno) (Caroteno, 2015). Ejemplos de la estructura química de algunos carotenos se muestran en la figura 10.

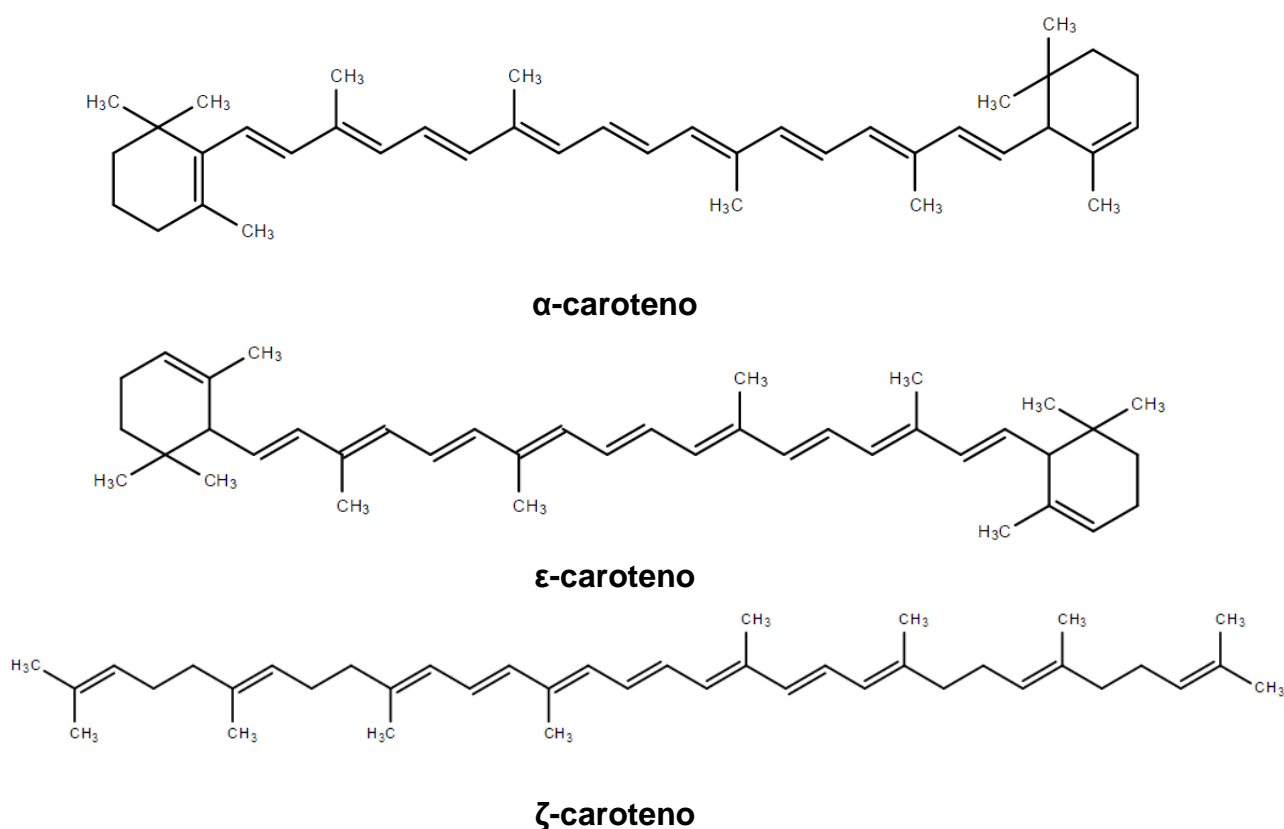


Figura 10 Estructura química de los carotenos alfa, épsilon y zeta.

A mayor número de dobles enlaces mayor longitud de onda de absorción. Por ejemplo, el fitoeno que tiene solo tres enlaces conjugados únicamente capta luz ultravioleta, por lo tanto es incoloro. El licopeno tiene once dobles enlaces conjugados, absorbe desde el ultravioleta hasta el rojo (Caroteno, 2015).

Para la cuantificación de un carotenoide o mezcla de carotenoides se debe disolver la muestra en un volumen conocido de un solvente apropiado, que normalmente es hexano, éter de petróleo ligero, acetona o etanol. Para la cuantificación de un carotenoide o mezcla de carotenoides se debe disolver la muestra en un volumen conocido de un solvente apropiado, que normalmente es hexano, éter de petróleo ligero, acetona o etanol.

La lectura del espectrofotómetro debe estar entre 0.3 y 0.7 unidades de absorbancia, para asegurar la linealidad de la medición y minimizar errores instrumentales. La medición se desarrolla usualmente a la longitud de onda de máxima absorción (450 nm) (Burgos & Calderón, 2009).

La cantidad X (mg) de un carotenoide presente en un volumen V (mL) de solución puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$X = \left(\frac{A \times V \times 1000}{A_{1cm}^{1\%} \times 100} \right)$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra

V = Volumen total del extracto

$A_{1cm}^{1\%}$ = Coeficiente de absortividad

La tabla 3 muestra el coeficiente de absorción específica para diferentes solventes y muestras de carotenoides.

Tabla 3 Coeficiente de absorción específica usados para la cuantificación de carotenoides

Fuente: (Burgos & Calderón, 2009)

Carotenoide	$A_{1\%}^{1\text{cm}}$	λ (nm)	Solvente
Anteraxantina	2350	446	Etanol
Astaxantina	2100	470	Hexano
Bixina	4200	456	Petróleo ligero
Cantaxantina	2200	466	Petróleo ligero
Capsantina	2072	483	Benceno
Capsorubina	2200	489	Benceno
α -caroteno	2800	444	Petróleo ligero
β -caroteno	2592	449	Petróleo ligero
δ -caroteno	3290	456	Petróleo ligero
γ -caroteno	3100	462	Petróleo ligero
ϵ -caroteno	3120	440	Petróleo ligero
ζ -caroteno	2555	400	Hexano
Crocetina	4320	450	Petróleo ligero
α -criptoxantina	2636	445	Petróleo ligero
β -criptoxantina	2386	449	Petróleo ligero
Luteina	2550	445	Etanol
Licopeno	3450	470	Petróleo ligero
Neoxantina	2243	439	Etanol
Neurosporene	2918	440	Hexano
Fitoeno	1250	286	Petróleo ligero
Fitoflueno	1350	348	Petróleo ligero
Violaxantina	2250	440	Etanol
Zeaxantina	2348	449	Petróleo ligero

La longitud de onda a la que absorbe un carotenoide específico está relacionada con su color. La tabla 4 muestra los colores de los carotenoides más comunes en alimentos color amarillo, rojo y anaranjado.

Tabla 4 Colores amarillo, rojo y anaranjado de carotenoides comunes en alimentos.

Fuente: (Burgos & Calderón, 2009)

Carotenoide	Color
ζ -caroteno	Anaranjado
α-caroteno	
β-caroteno	
violaxantina bislaurato	
β-criptoxantina	
β-criptoxantina 5,6-epóxido	
Zeaxantina	
Zeaxantina	Amarillo
ξ-caroteno	
Luteína	
Violaxantina	
α-caroteno	
licopeno	Rojo
γ-caroteno	
Astaxantina	
Capsantina	

El beta-caroteno, es el carotenoide más abundante en la naturaleza y de igual manera en nuestra alimentación. Ayuda a eliminar radicales libres previniendo el envejecimiento celular, es un precursor de la vitamina A (formula estructural en la figura 4). El beta-caroteno natural es transformado en Vitamina A en la mucosa del intestino delgado y ésta es almacenada principalmente en el hígado en forma de ésteres de retinol (genera pigmentos necesarios para el funcionamiento de la retina). También interviene en la reproducción y la lactancia (Ornelas, 2011). Está presente en: lechuga, zanahoria, berro, espinaca, pimientos, acelgas, tomate, col, durazno, etc. (Calvo, Química de los Alimentos) (Gottau, 2012).

- **LICOPENO.-** el licopeno es un carotenoide altamente lipofílico, acíclico con una cadena alifática de cuarenta carbonos, cuya estructura molecular se muestra en la figura 11.

Debido a la carencia de anillos en su estructura, no es precursor de la vitamina A. Tiene trece dobles enlaces de los cuales once son conjugados, lo cual le hace muy reactivo frente al oxígeno y a los radicales libres (Vitale, Bernatene, & Pomilio, 2010).

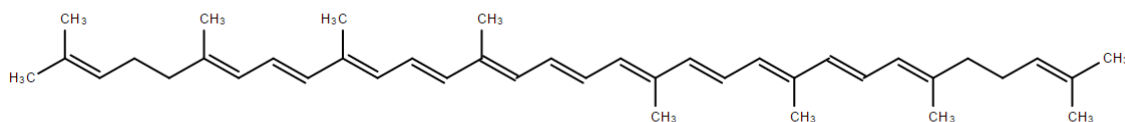


Figura 11 Estructura química del licopeno

Protege a las células humanas del estrés oxidativo, producido por la acción de los radicales libres. Se ha determinado que interviene en la regresión de un gran número de procesos cancerígenos y degenerativos asociados a daños oxidativos sobre el genoma y los mecanismos genéticos de control de la proliferación y diferenciación celular (Licopeno, 2015).

Está presente en: tomate, sandía, papaya, fresa, cereza, pimientos rojos, lechuga, zanahoria amarilla, etc (Licopeno, 2015) (Calvo, 1991).

SELENIO.- elemento no-metálico, del grupo VA, cuyo número atómico es 34. Es insoluble en agua, pero presenta solubilidad en disolventes orgánicos no polares. Se presenta de varias formas alotrópicas, de las cuales las más conocidas son:

- a) La vítrea, de color negro, se vuelve elástico por encima de 60°C y a temperaturas superiores, plástico.
- b) La coloidal, de color rojo con estructura monocíclica.
- c) La cristalina, de color gris y estructura hexagonal, es la forma más estable. (Jimenez, 2005)

Previene las reacciones excesivas de oxidación y su acción se relaciona con la actividad de la Vitamina E. Protege contra enfermedades cardiovasculares y estimula el sistema inmunológico. Retarda el proceso de envejecimiento celular y se asocia a la prevención del cáncer (Izquierdo & Cevallos, 2006). Se encuentra en: coles de Bruselas, brócoli, cereales integrales, cítricos, rábano, alfalfa, levadura de cerveza, cereales, algas marinas, ajos, cebollas, puerros, champiñón, germen de trigo, hígado de ternera, mariscos (Causse, 2014) (Cubero, Monferrer, & Villalta, 2002).

4.3.1 PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS NATURALES

Se han determinado muchas fuentes de elementos con capacidad antioxidante. La figura 12, indica los resultados de la capacidad antioxidante de varios alimentos, obtenidos con el método ORAC.

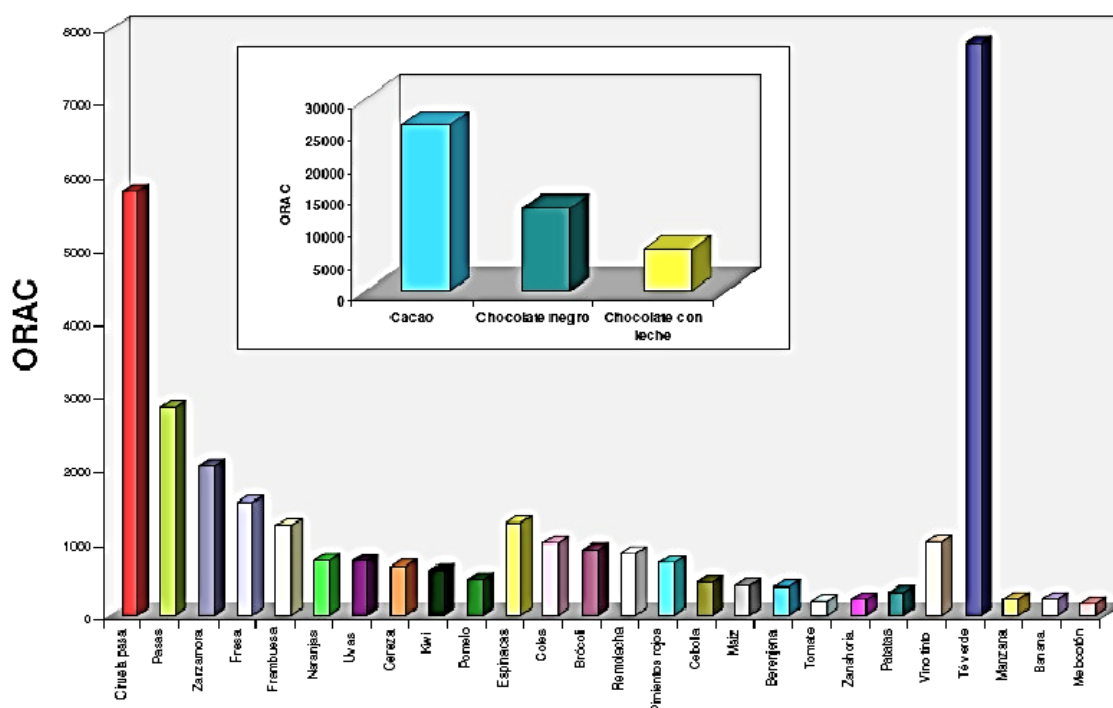


Figura 12: Capacidad antioxidante en alimentos determinada por el método ORAC. Fuente: (Lacalle, 2007)

A continuación se describe, en la Tabla 5, una lista de antioxidantes presentes en alimentos naturales.

Tabla 5 Antioxidantes naturales presentes en alimentos de consumo regular.
Fuente: (Causse, 2014) (Cubero, Monferrer, & Villalta, 2002) (Licopeno, 2015)
(Calvo, 1991)

ALIMENTO	ANTIOXIDANTE
Ajo	Alicina
Arroz	Arsenio
Banano	Potasio
Brócoli	Glutation
Cacao	Fosforo, Magnesio, Serotonina
Carne Roja	Zinc
Cebollas	Quercetina
Cúrcuma	Curcumina
Espinaca	Luteina, Hierro
Germen de trigo	Vitamina E
Haba	Magnesio, Lecitina
Hígado	Cobre

ALIMENTO	ANTIOXIDANTE
Leche	Magnesio
Lechuga	Beta – Caroteno, Magnesio
Limón	Esperidina
Manzana	Quercetina
Naranja	Vitamina C
Nueces	Vitamina E
Pimientos	Capsantina
Té Verde	Catequinas
Tomates	Licopeno
Uvas Negras	Resveratrol
Yema de huevo	Vitamina A
Zanahorias	Beta - Caroteno

4.3.2 PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS PROCESADOS

Con el desarrollo de la industria química-alimenticia se ha incrementado la producción de alimentos procesados y la adición de antioxidantes como perseverantes y suplementos nutricionales para el enriquecimiento del producto final.

De acuerdo a la legislación nacional para la elaboración de alimentos, la cual está regida por el Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, existe una lista de

antioxidantes autorizados en Ecuador, la cual se detalla en la tabla 6 y se profundiza en el anexo 1. La tabla 7 muestra los antioxidantes empleados en alimentos de consumo regular y su función en el alimento. Los antioxidantes permitidos a nivel global se mencionan en el anexo 2.

Tabla 6 Aditivos permitidos actualmente en Ecuador

Fuente: (INEN, 2013)

ANTIOXIDANTES *	
Ácido ascórbico	Etilendiaminotetracetato calcio disodio y cálcico disódico
Ascorbato de sodio	Fosfato diácido de calcio
Ascorbato de calcio	Galato de propilo
Ascorbato de potasio	Resina de guayaco
Ácido Cítrico	Sulfitos
Butilhidroxianisol (BHA)	Ácido tartárico
Butilhidroxitolueno (BHT)	Terbutilhidroquinona (TBHQ)
Citrato de estearilo	Ácido tiodipropiónico
Citratos de isopropilo	Tiodipropionato de dilaurolo
Cloruro estañoso	Tocoferol, d-alfa-
Palmitato de ascorbilo	Tocoferol concentrado, mezcla
Estearato de ascorbilo	Tocoferol, dl-alfa-

* Para mayor información respecto a los antioxidantes mencionados, revisar el Anexo 1.

Tabla 7 Antioxidantes artificiales presentes en alimentos de consumo regular

Fuente: (INEN, 2013) (Cubero, Monferrer, & Villalta, 2002)

ANTIOXIDANTE	FUNCIÓN	ALIMENTO
Ácido Eritórbico	Evita la formación de Nitrosaminas	Verduras congeladas
Ácido láctico	Agente controlador del PH	Alverjas, pepinos, alimentos infantiles
Alfa -Tocoferol	Previene la degradación oxidativa de los lípidos de origen animal	Aceites y grasas de origen animal
Ascorbato Cálcico	Evita la formación de Nitrosaminas	Manzanas, comida preparada
Ascorbato sódico	Evita la formación de Nitrosaminas	Embutidos
Butilhidroxianisol	Previene la degradación oxidativa de los lípidos, soporta altas temperaturas.	Mantequilla
Butilhidroxitoluol	Previene la degradación oxidativa de los lípidos, soporta altas temperaturas.	Yogurt
Delta-Tocoferol	Previene la degradación oxidativa de los lípidos	Embutidos
Eritorbato Sódico	Reduce la formación de nitrato a óxido nítrico	Salchichas, hamburguesas
Estearato de Ascorbilo	Antioxidante liposoluble	Margarinas
Tocoferoles	Previene la degradación oxidativa de los lípidos	Aceites vegetales
Extracto de romero	Evita la proliferación de hongos	Carne para asados
Galato de dodecilo	Evita la aparición de hongos	Leche en polvo
Galato de octilo	Previene la degradación de lípidos y la acción microbiana.	Chocolate mezclado con frutos secos
Galato de propilo	Evita la coloración azul de las grasas o aceites no soporta temperaturas mayores de 100 ° C	Aceites vegetales
Gamma- Tocoferol	Previene la degradación oxidativa de los lípidos de origen vegetal	Aceite de Oliva
Palmitato de Ascorbilo	Tiene propiedades emulsionantes	Extractos de caldo de pollo
Terbutilhidroquinona	Inhibe la auto-polimerización de peróxidos	Pescado congelado

4.4 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS

Existen dos aproximaciones metodológicas en relación a la determinación de antioxidantes en alimentos: se pueden identificar y cuantificar como compuestos individuales y por otro lado, es posible cuantificar la actividad antioxidante global de la muestra. En el primer caso, se hace uso de técnicas de separación con instrumentos de cromatografía líquida en sus diversas configuraciones; por ello, se estima conveniente explicar el principio de la técnica en este capítulo.

En el segundo caso, se conoce que existen dos grandes clases de métodos para evaluar la actividad antioxidante: *in vitro* e *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas son las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, que consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical (Cintra & Mancinil-Filho, 2002). Además, se puede clasificar a los métodos *in vitro* en función del compuesto al que está dirigida la medición, siendo esta directa o indirecta. En varios de estos métodos se emplea la espectrofotometría ultravioleta-visible para la cuantificación, por este motivo se explican primero los fundamentos de esta técnica.

Las determinaciones de la capacidad antioxidante *in vivo* (comportamiento dentro del organismo), no son empleadas en alimentos, por lo tanto no serán descritas en este trabajo.

4.4.1 ESPECTROMETRÍA UV-VIS

Esta técnica se basa en la cuantificación de las transiciones electrónicas producidas por la radiación absorbida por una molécula en una región específica del espectro electromagnético.

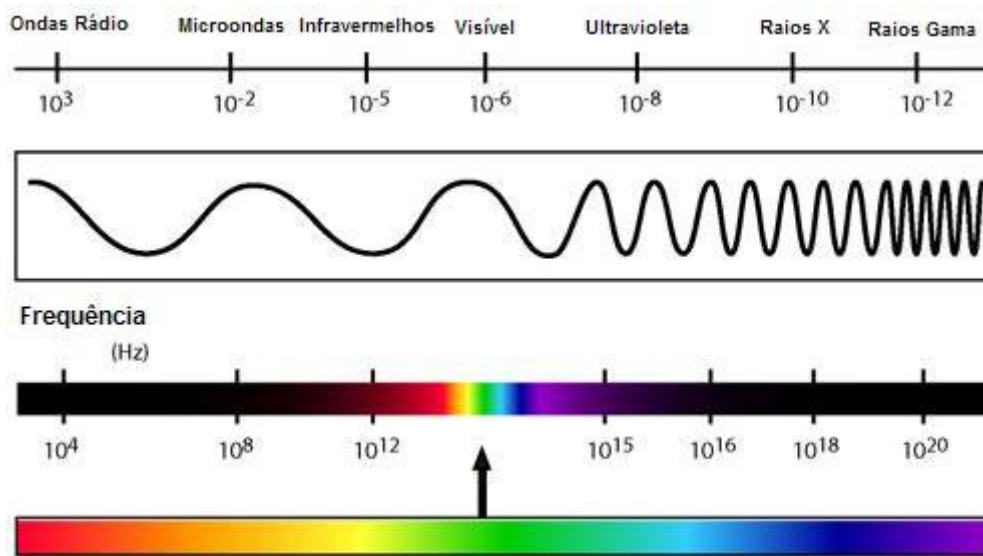


Figura 13 Espectro electromagnético

Fuente: (Oliveira, 2009)

El espectro electromagnético es la distribución energética de las emisiones electromagnéticas de acuerdo a su longitud de onda y comprende desde los rayos gamma que son los de menos longitud hasta las ondas de radio que son la de mayor longitud de onda, tal como se muestra en la figura 13 (Espectro Electromagnético, 2015).

En la espectrometría UV-VIS las medidas se realizan en las regiones visibles, ultravioleta cercana e infrarroja cercana, es decir de 200nm a 780nm. En esta zona los dobles y triples enlaces aislados no absorben. Sólo absorben enlaces pi-conjugados y heteroátomos con pares de electrones no compartidos (O, N) (Espectroscopia Ultravioleta-Visible, 2014).

La ley de Beer permite cuantificar la concentración de una muestra por UV-Vis y se la puede expresar de la siguiente forma:

$$A = \epsilon Cl$$

Dónde:

A Es la Absorbancia.

ϵ Es el Coeficiente de extinción (valor constante para una sustancia a una longitud de onda determinada).

l Es el Largo del paso de la celda (cm).

C Es la Concentración (moles/L).

La absorbancia es por lo tanto proporcional a la concentración molar de la muestra. Se debe considerar que a concentraciones altas la probabilidad de error y de valores fuera de rango aumenta, por lo que es recomendable correr una curva de calibración antes de medir las muestras de análisis.

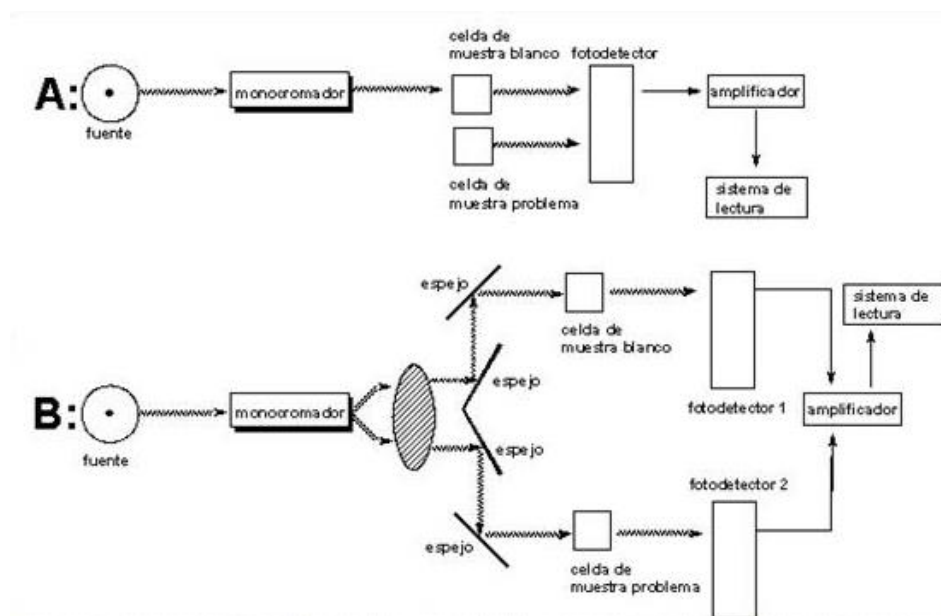


Figura 14 Diseño de Espectrómetros de haz sencillo (A) y de doble haz (B)

Fuente: (Curso Formación Técnico en "Laboratorio de Diagnóstico Clínico", 2014)

Un espectrofotómetro puede ser único o de doble haz, como se indica en la Figura 14. En un instrumento de un solo haz, toda la luz pasa a través de la celda que contiene la muestra, a la medida obtenida se deberá restar el valor del blanco, es decir la absorbancia de la celda únicamente con los solventes empleados. En un instrumento de doble haz, la luz se divide en dos haces antes de llegar a la muestra. Un haz se utiliza como referencia (blanco), y el otro haz de luz pasa a través de la muestra. Algunos instrumentos de doble haz tienen dos detectores (fotodiodos), y el haz de referencia y el de la muestra se miden al mismo tiempo. En otros instrumentos, el detector alterna entre la medida del haz de muestra y la del haz de referencia.

Las muestras para espectrofotometría UV-VIS suelen ser líquidas, aunque la absorbancia de los gases e incluso de los sólidos también puede medirse. Las muestras son colocadas en una celda transparente, cuyo diámetro interno es de 1 cm. Esta medida se convierte en la longitud de ruta (L), en la Ley de Lambert-Beer. En algunos instrumentos se puede usar tubos de ensayo como celdas. Las mejores celdas están hechas con cuarzo de alta calidad, aunque también se puede emplear vidrio o plástico (Espectroscopia Ultravioleta-Visible, 2014).

Los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo: agua para los compuestos solubles en agua, o etanol para compuestos orgánicos solubles. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico (Espectroscopia Ultravioleta-Visible, 2014).

4.4.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La cromatografía líquida es una técnica de separación de mezclas en la que los analitos interactúan con dos fases una estacionaria y una móvil. La Figura 15 muestra un diagrama de la estructura de este equipo.

Los principales mecanismos de interacción en cromatografía líquida son: adsorción superficial, coeficiente de partición, intercambio iónico y exclusión molecular

La repartición entre las dos fases depende del tamaño y propiedades de las partículas componentes de la fase estacionaria y la polaridad, afinidad y solubilidad de los analitos con los solventes empleados para la fase móvil. Los materiales que se emplean son: sílice, alúmina, kieselguhr, celulosa y poliamida.

La fase móvil suele ser una mezcla de solventes de diferentes polaridades que se emplea con el fin de aumentar la elución y la selectividad.

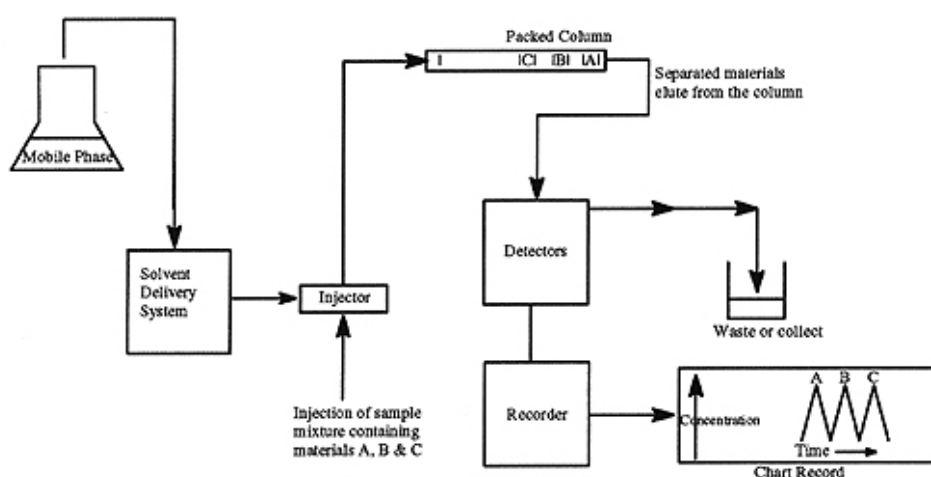


Figura 15 Diagrama de la estructura de un equipo de HPLC.

Fuente: (Técnicas de separación para la determinación de pesticidas en frutas y verduras, 2010)

Se puede trabajar de dos maneras distintas; fase normal, cuando se trabaja con fase estacionaria polar y fase móvil no polar, o fase reversa, cuando se emplea una fase estacionaria no polar y fase móvil polar.

Con esta técnica es posible realizar cuantificaciones simultáneas de diversas vitaminas siendo algunas de ellas carotenos, riboflavina, folatos, vitamina C, tiamina y piridoxina. Se ha comprobado que es altamente específico y no existen interferencias de otros compuestos, por lo que se utiliza para análisis de rutina.

Los resultados se obtienen al integrar el área de cada pico del cromatograma, estos datos son interpolados en la ecuación de la línea recta obtenida para cada sustancia para obtener la concentración en $\mu\text{g/ml}$. Entre las ventajas de este método se detalla que es un método reproducible y que el tiempo de análisis es relativamente corto, ofreciendo precisión y exactitud (Fernández, 1999, págs. 32-35)

Los tiempos de retención de los analitos de las muestras dependen del coeficiente de reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria, esto a su vez depende del tipo de material y el tipo de empaque de la columna. Existen varios tipos de columnas, los cuales se mencionan a continuación y cuyas características se mencionan en la tabla 8.

- Columnas capilares: también conocidas como microcolumnas. Las columnas capilares tienen un diámetro menor a 1 mm y hay de tres tipos: tubular abierto, parcialmente empacadas, y fuertemente empacadas. Estas columnas permiten trabajar con volúmenes de

muestra de nL, disminuyendo el flujo y el volumen de solvente usado. Sin embargo, la relación de flujo puede ser difícil de reproducir, el gradiente de elución no es tan eficiente, y se debe ser cuidadoso al emplear volúmenes tan pequeños de muestra.

- Columnas de microcalibre y de calibre estrecho: se usan para pequeños volúmenes de muestra. El diámetro típico es de 1-2 mm. De igual manera que en las columnas capilares, los instrumentos deben ser modificados para la cantidad de muestra aceptada por la columna. Existe una pérdida significativa en la resolución, debido a la cantidad de muestra inyectada.
- Columnas estándar: son las que se usan comúnmente. Su tamaño más habitual es de 2,4 mm de diámetro y 250 mm de largo, con un tamaño de partícula de 5 μm de diámetro. Las partículas pueden ser de sílica o de otros polímeros especiales que les confiere resistencia a determinadas condiciones (pH extremos) y a su vez pueden ser de forma esférica o irregular. Las partículas son de naturaleza porosa para aumentar la superficie de interacción con los analitos. Se considera el diámetro de poro (entre 100 y 300 Å.), debido a que también influye en la separación.
- Columnas rápidas: estas columnas se emplean para aumentar el número de muestras que se pueden procesar en un tiempo dado. Estas columnas tienen el mismo diámetro interno pero son más cortas que la mayoría de las columnas y están empacadas con pequeñas partículas

de 3 μm de diámetro. Las ventajas incluyen incremento de la sensibilidad, descenso en el tiempo de análisis, descenso en la fase móvil usada, e incremento en la reproducibilidad.

- Columnas preparativas: son columnas utilizadas con el objeto de permitir purificar grandes cantidades de muestra (mg). Una columna preparativa normalmente tiene un gran diámetro porque está diseñada para facilitar grandes volúmenes de inyección. (Pérez, 2005)

Tabla 8 Características de los distintos tipos de columnas

Fuente: (Pérez, 2005)

Tipo	Diámetro (mm)	Relación de flujo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Capacidad de muestra (μg)	Máxima carga de muestra (mg)
Capilar	0,075	0,25	0,05	-
	0,15	1,0	0,2	-
	0,30	5,0	1,0	-
	0,50	10	2,0	-
Microcalibre	1,0	25 - 50	0,05 - 10	-
Calibre estrecho	2,1	100 - 300	0,2 - 50	-
Analítica	4,6	500 - 1.500	1 - 200	10
Semi-preparativa	10	2.500 - 7.500	1.000	50
Preparativa	22	10.000 - 30.000	5.000	200

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna y medir la intensidad de la señal que emite. La tabla 9 muestra los distintos tipos de detectores empleados en HPLC.

Las características de un detector ideal son:

Sensibilidad: es la medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible. Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. El rango de sensibilidad va de 10^{-8} a 10^{-15} g/s de analito.

Linealidad: rango de concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria. El significado práctico de la linealidad del detector es el que le indica al analista la concentración para la cual el detector es confiable. Hay dos límites en la curva de linealidad:

- El límite de concentración inferior, que es dado por el límite de detección
- El límite Superior, definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad, normalmente se toma un 5% de desviación.

Tiempo de respuesta corto, independiente del caudal de salida.

Intervalo de temperatura de trabajo amplio, desde temperatura ambiente hasta unos 350-400 °C.

Estabilidad y reproducibilidad, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.

Alta fiabilidad y manejo sencillo

Ruido: es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal. Conocer el nivel de ruido de un detector sirve para la determinación de la cantidad mínima detectable y el límite inferior del rango lineal.

Límite de Detección: la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el doble del nivel de ruido.

Tabla 9 Tipos de detectores para HPLC

Fuente: (HPLC Detectors, 2014)

Detector índice refracción	Detector electroquímico
Detector evaporativo de dispersión de luz	Detector de conductividad
Detector fluorescencia	Detector IR de transformadas de fourier FTIR
Detección ultravioleta UV de: <ul style="list-style-type: none"> ▪ longitud de onda fija ▪ longitud de onda múltiple ▪ arreglo de fotodiodos 	Espectrometría de masas MS
	Plasma de acoplamiento inductivo ICP
	Detector de cátodo hueco

4.4.3 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DIRECTA

En estos métodos, el radical se emplea como el factor de cuantificación ya que produce una señal analítica que puede ser medida. La adición del antioxidante, antes o después de la generación del radical, provoca una disminución de la señal. En ensayos de inhibición, se añade la muestra a los sustratos de oxidación antes que se genere el radical: la reacción comienza con la adición del oxidante como $\text{ABTS}^{\bullet+}$, DPPH, DMPD, cada uno de los cuales da el nombre a los métodos que se detallan a continuación. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (en mM o μM) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g). El antioxidante de referencia Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 μM , en las mismas condiciones que la muestra, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL) (Fogliano, Verde, Randazzo, & Ritieni, 1999).

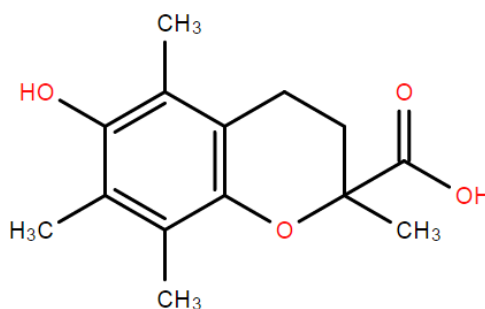


Figura 16 Estructura molecular del Trolox

Como se mencionó anteriormente, el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol o vitamina E, empleado en la elaboración de curvas de calibración, cuya estructura molecular se representa en la figura 16.

ABTS (ácido 2,2-azinobis,3-etilbenzothiazolín,6-sulfónico)

El radical $ABTS^{\bullet+}$ es generado a partir de su precursor el ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible como se muestra en la Figura 17.

El radical $ABTS^{\bullet+}$ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C y en la oscuridad durante 16 h. Formado el radical se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción).

Las muestras filtradas se disuelven con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 μ L de la muestra. A 980 μ L de dilución del radical $ABTS^{\bullet+}$ así generado se le determina la absorbancia a 754 nm (A_{754}) a 30°C, se añade 20 μ L de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la A_{754} pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua durante 7 minutos. (Kuskosi, A.G, Troncoso, García, & Fett, 2004).

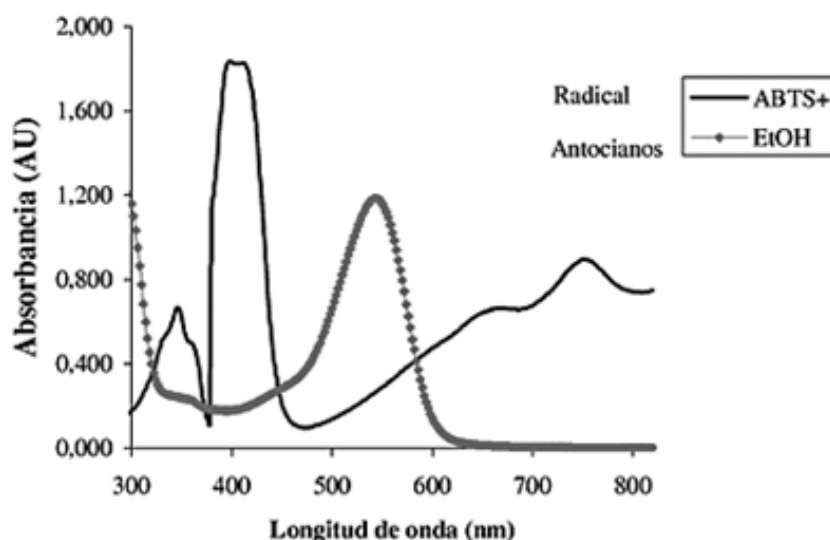


Figura 17 Ejemplo de resultado que muestra la superposición de los espectros de radical ABTS*+ y antocianos disueltos en etanol.

Fuente: (Kuskoski E. M., Asuero, García, Troncoso, & Fett, 2004)

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Esta técnica utiliza el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) como radical, el mismo que es un radical libre que se pudiera obtener directamente disolviendo el reactivo en un medio orgánico. La baja de DPPH se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica, que en forma de radical libre es de 515nm.

En esta técnica se emplea la medida de la absorbancia del radical DPPH[•] 100 µM (3,9 mL) disuelto en metanol al 80%, a la longitud de onda de 517nm. Se añade 0,1 mL de la muestra o patrón, después la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517nm se realizan antes de añadir la muestra transcurridos 30 y 60 minutos. La concentración de DPPH[•] en el

medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. (Brand, Cuvelier, & Berset, 1995, pág. 25) (Mesa-Vanegas A. , y otros, 2009)

DMPD (2,5dihidroximethyl-3,4-dihidroxipirrolidina)

En términos generales se determina la actividad antioxidante aplicando disolución de DMPD a una disolución de cloruro férrico de donde se forman radicales cationes coloreados (DMPD[•]), y se mide su absorbancia.

Este se fundamenta en añadir 1 ml de la disolución de DMPD 100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Se adiciona 0,2mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1mM) y se forman radicales cationes coloreados (DMPD[•]). Un mililitro de esta disolución se traslada a una celda midiéndose su absorbancia, la cual debe estar comprendida entre 0,90 ($\pm 0,1$), a 506nm. Se añade 50 μ L de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. (Fogliano, Verde, Randazzo, & Ritieni, 1999, pág. 1035)

4.4.2 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN INDIRECTA

Son métodos de determinación colorimétrica, que se fundamentan en que la presencia de radicales libres ocasiona la pérdida o la aparición de un determinado reactivo, por lo que, la existencia de un antioxidante provoca el aumento o disminución de la señal. Entre los métodos más destacados están: ORAC y FRAP. Al ser métodos colorimétricos se mide la absorbancia de los productos de la reacción a determinada longitud de onda.

ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)

El ensayo ORAC, capacidad de absorción de radicales de oxígeno (por sus siglas en inglés), mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente, sea esta B-ficoeritrina o fluoresceína, después de haber sido mezclada con generadores de radicales libres tales como compuestos azoderivados que producen radicales peroxilo por calentamiento, que daña la molécula fluorescente, resultando en pérdida de su fluorescencia. Los antioxidantes protegen la molécula fluorescente de la degeneración oxidativa, lo que se mide usando un fluorómetro que mide y calcula la capacidad automáticamente. La molécula fluoresceína es actualmente la más utilizada. (Mesa-Vanegas A. M., y otros, 2009)

La fluorescencia disminuye en intensidad a medida que avanza la degeneración oxidativa y se registran los valores durante 30 minutos después de agregar azoderivado. La degeneración de fluoresceína se mide en función del retardo en el decaimiento de fluorescencia, respecto a la presencia o no del antioxidante. Las curvas de caída (la intensidad de

fluorescencia respecto al tiempo) se registran y el área entre las dos curvas de caída (con o sin antioxidante) se calcula. El grado de protección antioxidante se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox como estándar. (Mesa-Vanegas A. M., y otros, 2009) (Mesa-Vanegas A. M., y otros, 2009)

FRAP (capacidad antioxidante reductora de hierro)

Este método se basa en la capacidad que tiene un antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, esto permite que en combinación con otros métodos se pueda determinar la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes

Es una técnica espectrofotométrica que mide la absorbancia del Fe^{2+} . A mayor actividad antioxidante mayor será la reducción y la concentración de Fe^{2+} , lo cual aumentará la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales Redox menores a 0,7 V (potencial Redox del Fe^{3+} -TPTZ). (Medina, 2010)

5. CASOS DE ESTUDIO DE VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS

A continuación, se detalla varios ensayos realizados con las técnicas mencionadas en el capítulo 4 y los resultados obtenidos por sus investigadores.

5.1 CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA A (RETINOL) EN AZÚCAR MORENO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA / VISIBLE, MÉTODO VALIDADO POR (Luna, 2013)

Por medio de su trabajo Luna, la validación del método de cuantificación de vitamina A (retinol) en azúcar morena por espectrofotometría ultravioleta / visible, empleando un Espectrofotómetro ultravioleta/visible SHIMADZU UV MINI 1240

El método utilizado para la cuantificación fue una modificación de la “Determinación espectrofotométrica de retinol en azúcar fortificada”, INCAP-CA-100B-1, del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). En esta modificación se aumentó el tamaño de la muestra de 20g a 100g, con el propósito de disminuir la influencia de la heterogeneidad de la distribución de vitamina A en el azúcar analizado.

La muestra utilizada fue específica y puntual ya que se trabajó con azúcar morena fortificada, producido únicamente por un ingenio azucarero. El procedimiento de muestreo utilizado fue el establecido por la Comisión Internacional para la Unificación de los Métodos de Análisis de Azúcar (siglas en inglés ICUMSA) el cual indica que para azúcar a granel el muestreo puede ser

estático, es decir durante operaciones de llenado o vaciado. Para esto, las muestras primarias deben de ser extraídas en varias porciones, a lo largo de toda la altura del contenedor mediante el empleo de un muestreador cilíndrico (tubo largo, con el fondo cerrado y provisto de una serie de ranuras longitudinales que permiten la entrada del azúcar en varias profundidades). Las posiciones de muestreo deben ser distribuidas uniformemente sobre el área del contenedor.

Las muestras de azúcar se disuelven en agua caliente para disolver la matriz del compuesto de vitamina A. luego se realiza una dilución 1:1 con hidróxido de sodio 0.1N para posteriormente realizar la extracción del palmitato de retinol en hexano. La concentración de retinol es determinada por absorbancia a 325nm.

Los parámetros de desempeño empleados en la validación fueron: exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, linealidad del método y del sistema, límite de cuantificación e intervalo (rango). Los parámetros y metodología se muestran en el Anexo 3.

Se obtuvo una exactitud con un porcentaje de recobro del 99.7%, la precisión en términos de repetibilidad con un CV 4.25 % y para la precisión intermedia de 3.8 %, linealidad del método con un coeficiente de determinación de 0.999 y un CV_{y/x} 2.05% y para el sistema coeficiente de determinación de 0.9995, límite de cuantificación a partir de 0.345 ppm y finalizando con un intervalo que comprende de 0.345 ppm a 25 ppm. Estos resultados se muestran en la tabla 10.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluyó que para cada uno de los parámetros de desempeño, el método de estudio es confiable y seguro ya que demostró ser lineal, exacto y preciso. (Luna, 2013)

Tabla 10 Resultados analíticos, estadísticos e interpretación de resultados de los parámetros de desempeño.

Fuente: (Luna, 2013)

	VALOR OBTENIDO	CRITERIO	RESULTADO
Exactitud	% Recobro = 99.7%	El porcentaje de recobro debe de estar entre el rango del 80 – 110%.	Conforme
	Estadístico t = 0.5555 valor tabla para t de dos colas = ± 2.2622	Que no exista diferencia significativa entre las media obtenidas de las dos variables de estudio para un nivel de confianza del 95%	Conforme
Precisión	Repetibilidad %CV = 4.25%	El porcentaje del coeficiente de variación no debe de superar el 7.3%	Conforme
	Precisión Intermedia %CV = 3.8%	El porcentaje del coeficiente de variación no debe de superar el 7.3%	Conforme
Linealidad del Método	$r^2 = 0.999$	El coeficiente de determinación deberá ser mayor a 0.98	Conforme
	b= 48.827 IC(b)= 48.096 , 49.558	El IC(b), el valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo.	Conforme
	a= 0.4148 IC(a)=0.1828 , 0.6468	El IC(a), el valor de la ordenada debe incluirse en el intervalo.	Conforme
	%CV(y/x)=2.05%	El %CV(y/x), no mayor del 3% si es químico o espectrofotométrico.	Conforme
Linealidad del Sistema	$r^2 = 0.999$	El coeficiente de determinación deberá ser mayor 0.98	Conforme
	b= 0.0902 IC(b)= 0.0875 , 0.0929	El IC(b), el valor de la pendiente debe incluirse en el intervalo.	Conforme
Límite de Cuantificación	LC= 0.345 ppm	N/A	Conforme
Intervalo / Rango	0.345 ppm – 25 ppm de vitamina A	Debe incluir la concentración inferior y superior del analito, con adecuada precisión, exactitud y linealidad.	Conforme

5.2 DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VITAMINA A EN MUESTRAS DE LECHE, MÉTODO VALIDADO POR (Araujo, y otros, 2013)

Por medio de este estudio los autores buscaban validar un método para determinar vitamina A en leche en polvo, empleando como método de determinación HPLC.

Se analizaron tres marcas de leche en polvo comercial y de cada una se analizaron dos lotes. Por cada lote se analizaron tres muestras por triplicado, obteniendo un total de 18 muestras.

Se utilizó un sistema HPLC (Agilent Technologies) equipado con inyector manual, bomba con sistema de gasificación, detector de arreglo de diodos (longitud de onda variable), integrador y software para el procesamiento de datos cromatográficos. La separación cromatográfica se realizó en una columna cromatográfica de acero inoxidable C18 para fase reversa de 25cm x 4,6mm de diámetro interno y 5µm de diámetro de partícula, con guarda-columna con cartucho C18.

Los reactivos utilizados fueron vitamina A palmitato (1g = 1800000UI), metanol y etanol grado HPLC, hidróxido de sodio al 98%, ácido ascórbico, hexano grado HPLC y 2-Propanol.

Durante la realización de la curva de calibración se pesó 0,1g de vitamina A de concentración 1.800.000UI g⁻¹, se colocó en un matraz de 500 mL y se agregó metanol grado HPLC hasta el aforo para obtener una concentración de 200mg/L, luego se calculó el volumen necesario para la preparación de los patrones.

Para la extracción de la Vitamina de las muestras de leche, se pesó 20 g de muestra en un balón de base plana de 1000 mL, se adicionó 70 mL de etanol absoluto, se burbujeó nitrógeno por cinco segundos, se tapó y se calentó a 40°C durante 40 minutos. Luego, se agregó 20 mL de solución de KOH al 50% y se saponificó la mezcla por 40 minutos con una agitación de 200 rpm en la centrifuga. Se agregaron tres porciones de agua (20 mL, 20 mL y 10 mL) con reposo de 10 minutos entre cada adición. La solución se agitó, enfrió a temperatura ambiente y se filtró al vacío.

Luego se colocó el filtrado en 50 mL de hexano, se agitó durante 20 segundos y se esperó la separación de las fases. La fase superior (fase orgánica) se colocó en un balón de 250 mL de base redonda, que contenía aproximadamente 0,5 g de ácido ascórbico. La extracción se repitió dos veces más y los extractos se juntaron en el balón. Se evaporó a sequedad el solvente, haciendo uso de un rotavapor con baño de agua a 40°C. El residuo se diluyó inmediatamente con metanol grado HPLC y se aforó a 10 mL. Finalmente, la solución se pasó por un filtro de 0,2 μm y se inyectó manualmente en el cromatógrafo. Cada muestra pasó también por un proceso de degradación artificial, calentamiento a 80°C, oxidación con agua oxigenada y exposición a la luz solar indirecta por 60 días, para luego ser inyectadas nuevamente en el cromatógrafo. Las figuras 18 y 19 muestran los cromatogramas obtenidos.

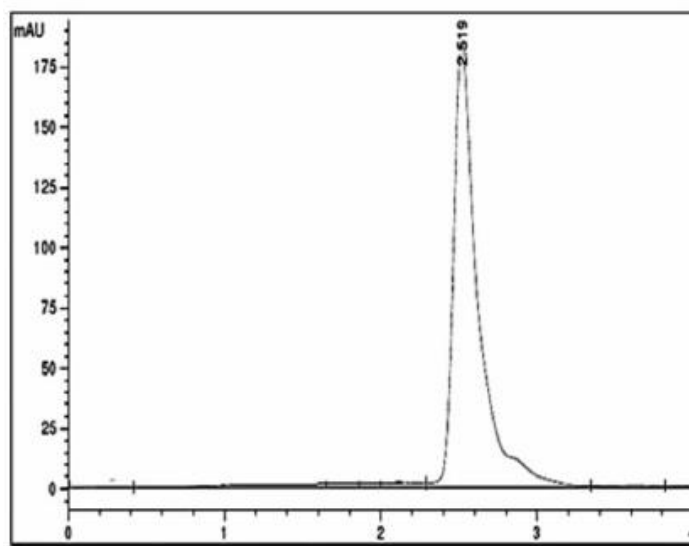


Figura 18 Cromatograma de la muestra sin alteración

Fuente: (Araujo, y otros, 2013)

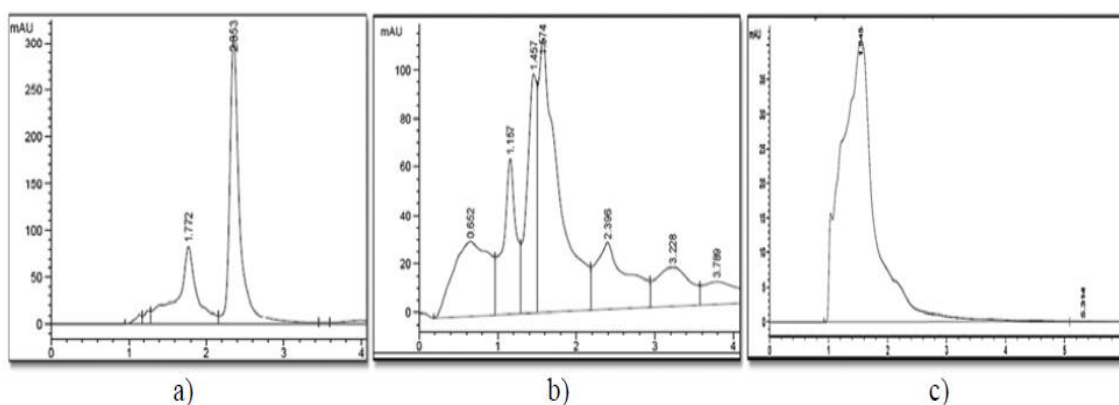


Figura 19 Cromatograma luego de degradaciones artificiales, (a) calentamiento a 80°C, (b) oxidación con agua oxigenada y (c) exposición a la luz solar indirecta por 60 días.

Fuente: (Araujo, y otros, 2013)

Los resultados obtenidos expresados en mg/L se indican en la tabla 11. Con el fin de contrastar los resultados de Vitamina A para cada marca, se los comparó con la norma Covenin, para lo cual se expresó los resultados en Unidades internacionales, de acuerdo a los valores de la tabla 12.

Tabla 11 Valores promedio del contenido de Vitamina A, resultados expresados en mg/L

Fuente: (Araujo, y otros, 2013)

	Contenido de Vitamina A (mg L ⁻¹)		
	MARCA A	MARCA B	MARCA C
Lote 1	27,57 ±3,88 ^a	21,05 ±2,68 ^a	20,05 ±1,18 ^a
Lote 2	21,47 ±1,15 ^b	21,28 ±1,49 ^a	19,69±2,04 ^a

Tabla 12 Comparación de las marcas con la norma Covenin

Fuente: (Araujo, y otros, 2013)

Norma COVENIN	3200UI
Leche Marca A	1980 UI
Leche Marca B	1976UI
Leche Marca C	1922UI

Los parámetros evaluados para la validación del método fueron selectividad, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad.

Se obtuvo una exactitud con un porcentaje de recobro del 98.6%, la precisión en términos de repetibilidad con un CV 1.37 % y para la precisión intermedia de 3.8 %, linealidad del método con un coeficiente de determinación de 0.98 y un CVy/x 2.05% y para el sistema coeficiente de determinación de 0.98, límite de cuantificación a partir 5.45 mg L⁻¹ y límite de detección 2.12 mg L⁻¹, para un intervalo de confianza del intercepto de -49.60 -150,92, lo cual se muestra en la tabla 13.

Tabla 13 Resultados de la validación del método

Fuente: (Araujo, y otros, 2013)

	Parámetro	Resultado	Criterio
Linealidad	Curva de regresión	61,66x+50,659	
	Rango lineal (mg L ⁻¹)	5-40	
	Coefficiente de correlación	0,99	$R \geq 0,99$
	Coefficiente de determinación	0,98	$R^2 \geq 0,98$
	Coefficiente de variación de los factores de respuesta	2,7%	5%
	T de Student (<i>tr</i>) (95%)	2,57 > 2,45	$tr > T_{\text{tabulado}}$
	Intervalo de confianza del intercepto	-49,60 - 150,92	Debe incluir el cero
Repetibilidad	Media	22,36 mg L ⁻¹	
	RSD (%)	1,37	< 1,5%
	Límite de confianza	22,36 ± 0,99	($\bar{x} \pm 3$) (95%)
Reproducibilidad	Media	22,48 mg L ⁻¹	
	RSD %	1,83	< 2%
Exactitud (% de recuperación)	Bajo nivel de analito agregado (20%)	90,0%	
	Prueba T de Student	0,29 < 4,3	$T_{\text{ob}}^* < T_{\text{tabulado}}$
	Alto nivel de analito agregado (100%)	98,6%	
	Prueba T de Student	0,11 < 4,3	$T_{\text{ob}}^* < T_{\text{tabulado}}$
Sensibilidad	Límite de detección	2,12 mg L ⁻¹	
	Límite de cuantificación	5,54 mg L ⁻¹	

Tob* = Tobtenidos

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluyó que cada uno de los parámetros de desempeño aplicando el método HPLC, es confiable sencillo y seguro ya que demostró ser lineal, exacto, sensible, selecto y preciso, por lo que se puede concluir que el método es efectivo para detectar y cuantificar vitamina A en las matrices analizadas.

5.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN UCHUVA (uvilla) (*Physalis peruviana* L.) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, DESARROLLADO POR (Gutierrez, Hoyos, & Páez, 2007)

A través de este estudio, las autoras buscaban determinar las condiciones óptimas para la extracción, identificación y cuantificación de Vitamina C – Ácido Ascórbico, por cromatografía líquida de alta resolución en la uchuva o uvilla utilizando una columna Hypersil C18 ODS μ 5 m x 4,0 mm x 250 mm.

Los reactivos empleados para el desarrollo experimental fueron de grado analítico. Las soluciones patrón se prepararon con: L-ascórbico 99,9 % con ácido fosfórico 0,05 N en agua deionizada: Para la extracción del ácido ascórbico en la fruta se empleó: Ácido fosfórico, 85 %, Ácido sulfúrico: 95 - 97 % y Fosfato monobásico de potasio: 99,5 %.

Las fases móviles empleadas para optimizar la elución en el cromatógrafo fueron: Fosfato de sodio monobásico: 99,2 %, Metanol HPLC: 99,9 % y Acetonitrilo HPLC: 99,9 %. Todas las soluciones se prepararon con agua deionizada, cuya conductividad registró valores entre 0,5 a 0,8 μ S.

En la optimización del procedimiento de extracción del ácido ascórbico de la fruta (se trabajó con el fruto comestible) se evaluaron tres metodologías diferentes; el procedimiento de Johnston que propone la maceración y posterior liofilización, además de la extracción con una solución tampón de acetato de

sodio, filtración e inyección, por triplicado, al cromatógrafo de líquidos. Los resultados se muestran en la figura 20.

El segundo y tercer método consistió en la extracción con Agua-Ácido sulfúrico y con Ácido fosfórico 0,05 N respectivamente, se realizó una extracción sólido-líquido por espacio de 30 minutos, al término de los cuales se centrifugó a 6000 r.p.m. por 20 min, posteriormente se realizó la separación de la fase acuosa; se filtró, se aforó e inyectó, por triplicado al cromatógrafo de líquidos. La figura 21 muestra el cromatograma obtenido de la extracción con ácido fosfórico.

Para los análisis se trabajó con un tamaño de muestra de 25,5020 g de fruta; con la técnica de extracción adecuada se optimizó el volumen del solvente extractor, entre 60 y 120 mL, la fruta se mantuvo a 4°C.

Se optimizó la fase móvil y la longitud de onda del detector con una solución patrón de ácido ascórbico de 50 mg/L en ácido fosfórico 0,05 N a una longitud de onda de barrido entre 200 a 320 nm, para obtener la mayor sensibilidad y resolución en la señal cromatográfica. Para lo cual se realizaron ensayos con las siguientes fases móviles: KH_2PO_4 2 %, pH = 2; Acetonitrilo-Agua, (70:30); NaH_2PO_4 1 %, pH = 2,7 Metanol-Solución reguladora de: KH_2PO_4 0,03 M; pH = 2,7, (99:1) Agua-Metanol-Acetonitrilo (74,4: 25,0: 0,6).

Se realizaron ensayos de curva de adición estándar y curva de calibración con patrones de ácido ascórbico entre 1,0 a 25,0 mg/L en ácido fosfórico 0,05 N, para determinar el efecto matriz en el método de cuantificación.

Una vez determinados los parámetros de cuantificación del ácido ascórbico, se prosiguió a determinar su contenido en la muestra (Uvilla). Para lo cual se tomó 12,75 g de uvilla, y se efectuó el método de extracción correspondiente; al final el sobrenadante se aforó a 100 mL con ácido fosfórico 0,05 N, se filtró con membrana 0.45 μ m, se realizó la dilución correspondiente e inyectó al cromatógrafo de líquidos por triplicado.

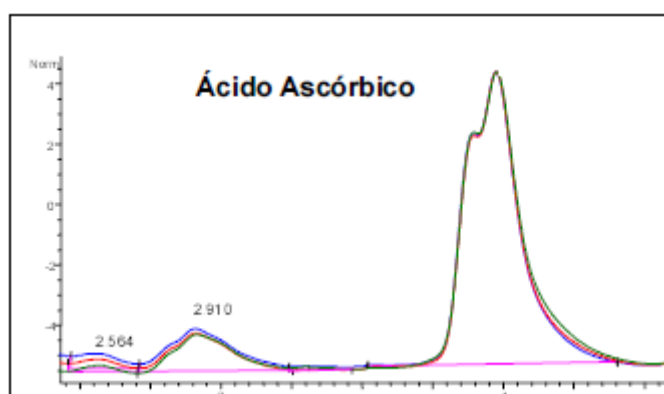


Figura 20 Cromatograma del AA extraído de la uvilla, según el método de Johnston

Fuente: (Gutierrez, Hoyos, & Páez, 2007)

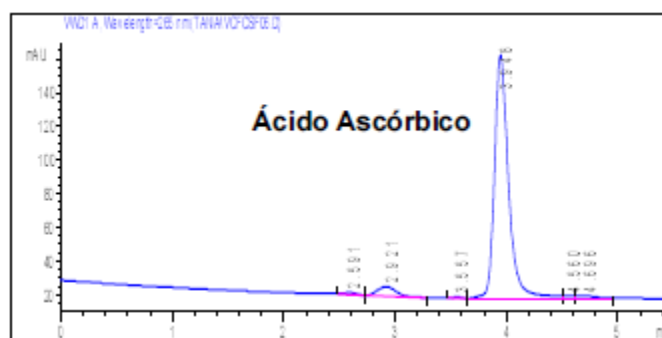


Figura 21 Cromatograma de la muestra de uvilla extraída por el método de ácido fosfórico.

Fuente: (Gutierrez, Hoyos, & Páez, 2007)

Con la metodología de Agua- ácido sulfúrico se obtuvieron porcentajes de recuperación del 85,05 %. A la metodología del ácido fosfórico al 0,05 N, se le optimizó la cantidad de solución extractora respecto a la cantidad de muestra; para ello, se realizó una curva entre la concentración de ácido ascórbico extraído y el volumen de ácido fosfórico al 0,05 N adicionado (en mL).

Por el método del ácido fosfórico se encontraron porcentajes de recuperación entre el 92,36 y 100,4 %; las condiciones de operación más adecuadas para la cuantificación del ácido ascórbico por HPLC, fueron, fase móvil: NaH_2PO_4 al 1 % pH = 2,7; fase estacionaria: Hypersil C18 ODS $\mu 5$ m x 4,0 mm x 250 mm; longitud de máxima absorción: 265 nm y un flujo: 0,9 mL/min.

La metodología de cuantificación presentó linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad a un nivel de confianza del 95%. El contenido de ácido ascórbico determinado para la uvilla fue de 0,3320 mg ($\pm 0,0262$) por gramo de muestra, el método no presentó efectos de matriz dadas las condiciones de acidez que favorecen la estabilidad del ácido en el fruto. (Gutierrez, Hoyos, & Páez, 2007)

5.4 DESARROLLO DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS, VALIDADO POR (Odorissi, Mercadante, Domingos, & Viotto, 2012)

Por medio de este trabajo sus autores pretenden desarrollar y validar un método simple, de bajo costo y reproducible para la extracción y cuantificación por espectrofotometría UV-visible de los carotenoides en yogur agregado de colorante natural a base de luteína, empleando muestras de leche en polvo desnatado Molico® adquiridas en un mismo supermercado y siendo todas del mismo lote.

Para la extracción de los carotenoides totales, los solventes testeados fueron la acetona, el acetato de etilo y el tetrahidrofurano, combinados a los siguientes equipos para extracción: mesa agitadora, homogeneizador, agitador tipo Vortex y mortero. Las combinaciones de solvente y equipo de extracción fueron realizadas de acuerdo a los métodos ya existentes en la literatura para la determinación de carotenoides en leche y productos lácteos. Luego de cada extracción, el solvente fue completamente evaporado y el extracto seco fue redissuelto en etanol para la cuantificación de los carotenoides totales.

La determinación de los carotenoides totales fue realizada por espectrofotometría en el UV-visible, por la lectura de la absorbancia del extracto etanólico de carotenoides en la longitud de onda de 445 nm, λ_{max} de absorción de la luteína en etanol. La concentración de los carotenoides totales fue calculada a partir de la Ley de Lambert-Beer:

$$C (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{A \times 10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

donde “C” es la concentración de carotenoides totales (expresada como luteína). “A” es la absorbancia del extracto a 445 nm y “ $E1\% 1cm$ ” es el coeficiente de absorptividad de la luteína en etanol que corresponde a 2550.

La determinación de carotenoides totales fue realizada en el yogur control para verificar si la concentración de carotenoides presente en este yogur interfiere en la cuantificación de los carotenoides totales en el yogur con el agregado de colorante luteína.

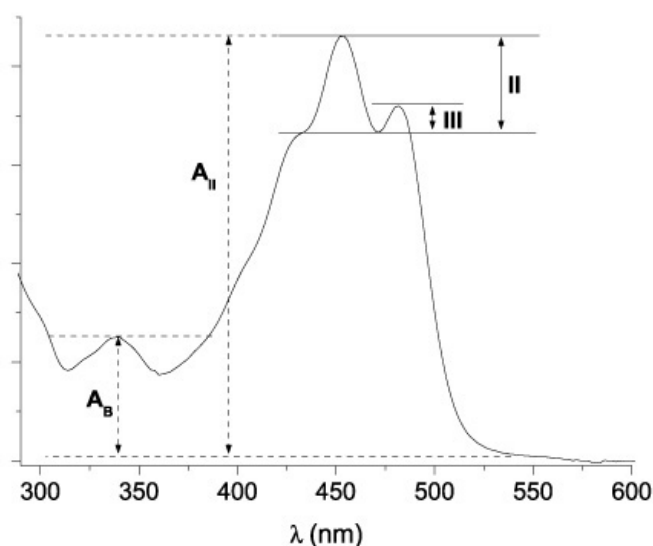


Figura 22 Parámetros utilizados para el cálculo de la estructura fina e intensidad de pico “cis” del espectro UV-VIS del carenoide.

Fuente: (Odorissi, Mercadante, Domingos, & Viotto, 2012)

Luego del análisis de las diferentes combinaciones entre solventes y equipos para la extracción de los carotenoides, el método que presentó los mejores resultados fue validado a través de los parámetros de selectividad, la linealidad, la banda de aplicación, los límites de detección y de cuantificación, la precisión y la exactitud.

El valor de los carotenoides totales del yogur control fue inferior al límite de cuantificación del método desarrollado ($1,28 \mu\text{g g}^{-1}$) comprobando que no hubo interferencia de los carotenoides provenientes de la leche desnatada en la cuantificación de los carotenoides totales del yogur con el agregado del colorante luteína. El espectro obtenido se muestra en la figura 23.

La selectividad del método consistió en la capacidad de medir un compuesto en la presencia de otros componentes o sustancias interferentes. El espectro de absorción del extracto del yogur control no interfirió ni se superpuso, al espectro del extracto del yogur agregado del colorante en la región espectral próxima a 445 nm.

Tabla 14 Resultados de la linealidad del método

Fuente: (Odorissi, Mercadante, Domingos, & Viotto, 2012)

Parámetros	Resultados
Banda de linealidad	$1,41 - 13,42 \mu\text{g g}^{-1}$
Ecuación: $y = ax + b$	$y = 0,0274x - 0,0035$
Coefficiente angular \pm D.P. ^(a)	$0,0274 \pm 0,0030$
Coefficiente linear \pm D.P. ^(a)	$-0,0035 \pm 0,0144$
Coefficiente de determinación	0,9938

^(a) = resultados expresados como media \pm desvío patrón de tres repeticiones.

Tabla 15 Recuperación de la luteína en las muestras de yogur con el agregado de colorante a base de luteína

Fuente: (Odorissi, Mercadante, Domingos, & Viotto, 2012)

Concentración agregada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$) ⁽¹⁾	Recuperación ⁽²⁾ (%)
5,53	$5,46 \pm 0,31$	99
11,49	$10,96 \pm 0,14$	95
13,45	$13,91 \pm 0,05$	103

⁽¹⁾ = Resultados expresados como media \pm desvío patrón de tres repeticiones.

⁽²⁾ = Calculada a partir de la media de la concentración de tres repeticiones

La banda de linealidad del método fue de 1,41 a 13,42 $\mu\text{g g}^{-1}$ y los parámetros de la curva analítica son presentados en la tabla 16. Estos parámetros fueron utilizados para la determinación del LD y LQ que fueron de 0,42 y 1,28 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, indicando una buena sensibilidad.

Los límites de detección y límites de cuantificación estimados matemáticamente por la curva de dilución del colorante fueron extremadamente bajos, $3,62 \times 10^{-16}$ y $1,10 \times 10^{-15} \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, siendo experimentalmente impracticables para el yogur utilizando el método propuesto. Por consiguiente, fue empleado el método de superposición de la matriz para la determinación de la banda de aplicación y los límites, construyéndose la curva analítica con extractos obtenidos a partir de muestras del yogur agregadas de diferentes concentraciones con el colorante luteína. Este método de superposición es utilizado para compensar el efecto de la matriz o los posibles interferentes y provee una mejor correspondencia con la composición de la muestra. Además de eso es deseable que la banda de aplicación y los límites estén en la misma unidad de los resultados obtenidos por el método en el caso $\mu\text{g g}^{-1}$.

El valor del DPR que expresa la repetibilidad del método fue igual a 3,4%. Los métodos para el análisis de compuestos presentes en niveles de concentración de $\mu\text{g g}^{-1}$ deben presentar DPR inferior a 16%. (29) De esta forma el método desarrollado en el presente estudio presentó un excelente DPR, probablemente debido al bajo número de etapas y su simplicidad. La exactitud del procedimiento analítico fue evaluada por análisis de recuperación en tres niveles de agregado y varió de 95 a 103% tabla 17. Considerando que los valores de

recuperación en todos los niveles analizados fueron próximos al 100%, el método fue considerado exacto.

El método propuesto para la extracción y la cuantificación por espectrofotometría en el UV-visible de los carotenoides en el yogur con el agregado de colorante a base de luteína demostró selectividad, linealidad en la banda estudiada, sensibilidad, precisión y exactitud adecuadas. Este nuevo método se presenta como una alternativa más rápida, de fácil ejecución y de bajo costo para la cuantificación de colorante a base de luteína, agregado al yogur.

5.5 DETERMINACIÓN DE BETA-CAROTENO EN ACEITE DE PALMA POR HPLC CON DETECTOR UV, VALIDADO POR (Hernández, Aldana, & Rodríguez, 2011)

Por medio de este estudio, las autoras validaron un método para la determinación de β -caroteno en aceite de Palma y otros aceites comestibles empleando HPLC con detector UV. Se buscó implementar una metodología sencilla, rápida y de fácil aplicación, para ser utilizada en laboratorios de baja infraestructura que analizan de manera rutinaria beta-caroteno en muestras de aceite.

La selección de la metodología se realizó basada en las diferentes referencias bibliográficas y la infraestructura con que se cuenta en los laboratorios de análisis de aceites.

Se utilizó estándar de beta-caroteno del 95 % de pureza. Los solventes utilizados fueron isopropanol y metanol grado HPLC, cloroformo grado analítico, agua grado HPLC tipo I según ASTM y gas nitrógeno. La solución patrón de β -caroteno 100ug/ml se preparó en cloroformo grado analítico; a partir de esta solución se prepararon soluciones de trabajo en fase móvil, las cuales se guardaron en viales ámbar, con atmósfera de nitrógeno y se almacenaron a temperatura de refrigeración.

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC, bomba cuaternaria, detector UV/VIS, inyector manual con loop de 20 μ L y adquisición de datos por integrador. Se utilizó una columna analítica de fase reversa C-18, 150 mm x 4,6 mm, 5 μ m.

El análisis se realizó a temperatura ambiente, con fase móvil isopropanol/metanol (65:35), flujo 1,0 ml/min y tiempo de corrida de 13 minutos. La detección se hizo a una longitud de onda de 450 nm.

Las muestras de aceite para análisis fueron almacenadas en frascos ambar y refrigerados tan pronto se las recibió, para reducir el efecto de la luz y el calor sobre los analitos. La primera dilución se realizó en cloroformo y a partir de esta, se realizaron diferentes diluciones en fase móvil para su posterior inyección en el HPLC, las muestras que no se analizaron inmediatamente fueron almacenadas en atmósfera de nitrógeno y en recipientes adecuados para evitar la foto-oxidación.

La metodología se validó siguiendo los lineamientos de organismos internacionales reconocidos; Asociación Oficial de Químicos Analistas AOAC, el Codex Alimentarius, la Oficina para la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos FDA, Eurachem (1998), evaluando los parámetros de linealidad del sistema y de método, rango lineal, especificidad, selectividad, exactitud, precisión del sistema en los niveles de repetibilidad y precisión intermedia, límite de detección y límite de cuantificación, sensibilidad, incertidumbre, robustez y rango de aplicabilidad a las matrices de interés. El procedimiento y resultados se describen a continuación:

Para determinar la especificidad del método se analizó el estándar de β -caroteno, blancos de reactivos y aceites en cuya composición y por su origen no se describe la presencia de carotenos. Se estudiaron aceites almacenados por largo tiempo, aceites utilizados en procesos de freído, procesados con otros alimentos y productos de uso externo para aplicación cosmética. Se evaluaron los cromatogramas obtenidos, con el fin de determinar interferencias en los blancos y

demás aceites analizados. No se detectaron respuestas presentes en la ventana del tiempo de retención de los analitos de interés.

Se validó la linealidad de la metodología, partiendo de una solución concentrada de estándar de β -caroteno, se prepararon tres curvas de calibración, cada una de seis niveles de concentración de analito, de 1.0 a 10.0 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó análisis de varianza ANOVA, utilizando el estadístico F de Fisher, para demostrar la regresión y la linealidad. Para todos los descriptores de la curva de calibración; intercepto, pendiente y coeficiente de correlación, se obtuvo un nivel de confianza del 95%, lo cual se muestra en la figura 22.

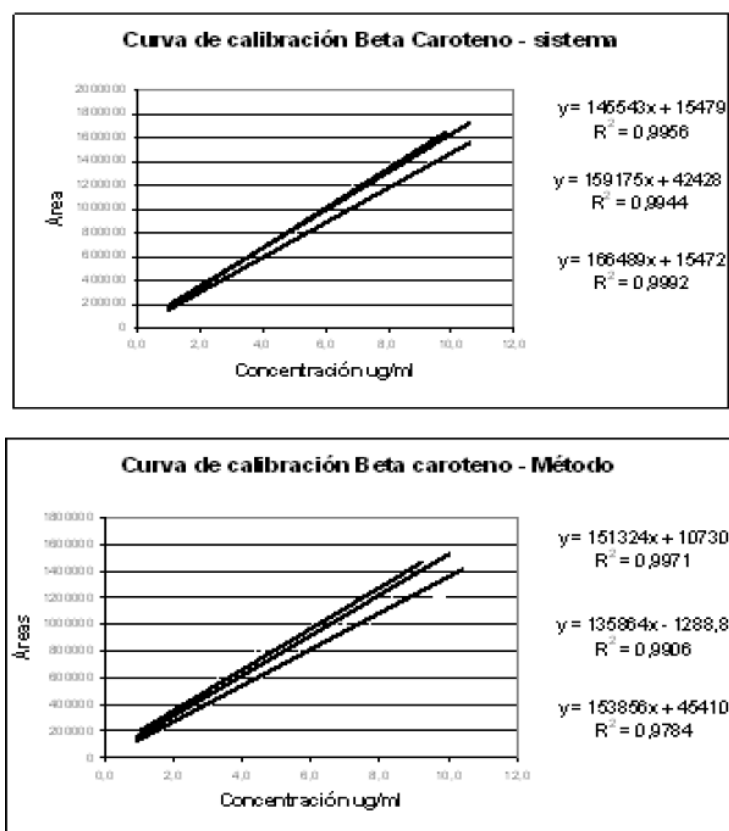


Figura 23 Curva de calibración β -caroteno – sistema y método

Fuente: (Hernández, Aldana, & Rodríguez, 2011)

Se evaluó la precisión de los niveles de repetibilidad y la precisión intermedia, en el rango de trabajo determinado en la linealidad, con diez réplicas por nivel. Se calculó la desviación estándar relativa y el límite de repetibilidad (r). El análisis de los datos demostró que el método presenta precisión en los dos niveles evaluados. El límite de repetibilidad, permitió determinar la máxima variabilidad en la respuesta de dos muestras “idénticas”. La tabla 14 muestra un resumen del análisis de precisión del sistema y el método.

Tabla 16 Precisión en la determinación de β -caroteno

CONCENTRACIÓN	SISTEMA		METODO	
	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
ug/ml	DER (%)	DER GLOBAL (%)	DER (%)	DER GLOBAL (%)
1,0	6,84	8,54	2,35	6,53
3,0	4,11	7,50	1,09	9,82
5,0	1,03	5,33	2,95	5,86
7,4	2,95	3,57	2,28	8,65
8,5	1,71	3,60	3,29	5,94
10,6	1,97	4,29	1,44	8,01
DER DE REFERENCIA (%)		10,72	n = 10	

El límite de detección se realizó por dos métodos diferentes:

- 1) Haciendo diluciones a partir de la menor concentración dentro del rango de linealidad, comparando los cromatogramas hasta poder diferenciar claramente la señal, de la del ruido.
- 2) Evaluando estadísticamente el valor obtenido a partir de una curva de calibración en rango menor al lineal. El valor obtenido fue de 0,2 μ g/mL.

De la misma manera se estimó el límite de cuantificación asumiendo un factor de diez para obtener un valor de 0,6 ug/mL con precisión de 7,2%.

La exactitud se evaluó estimando la recuperación del analito, al analizar β -caroteno en solución, en matrices de aceite enriquecidas con cantidades conocidas en el rango de trabajo. El porcentaje de recuperación de la metodología fue de 102,5 % (98,5 – 107,1).

Para determinar la robustez del método se identificaron 7 factores críticos del procedimiento y se aplicaron variaciones ligeras a los factores seleccionados. Los factores fueron: cambios en la fase móvil, longitud de onda y solubilidad.

Luego de validar el método, se analizaron muestras de aceite de Palma y otros subproductos. La diferencia en el contenido de β -caroteno para los subproductos se muestra en la tabla 15.

Tabla 17 Resultados de β -caroteno en aceite y otros subproductos de Palma

IDENTIFICACIÓN	n	DER %	CONCENTRACIÓN DE β -CAROTENO (mg/kg)
Aceite de palma	3	0,01	27,4
Aceite de fibra de palma	3	0,03	1102,1
Caroteno	3	0,01	33,2

Los resultados obtenidos indican que el método permite una separación y cuantificación de los principales carotenos, empleando un sistema de detección HPLC / UV-VIS que es el más común en los laboratorios de control de calidad. La metodología validada se encuentra dentro de especificaciones, por lo cual se concluye que es idónea y confiable para la determinación de β -caroteno en muestras de aceite de Palma, subproductos y otros aceites de uso comestible y cosmético.

5.6 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (ORAC_{FL}) DE PULPAS DE FRUTOS CONGELADOS, DETERMINADO POR (Kuskoski E. M., Asuero, Troncoso, & Fett, 2006)

Por medio de este estudio los autores buscaban determinar la actividad antioxidante en pulpas de frutas congeladas, empleando como método de análisis la técnica ORAC_{FL} y su relación con el contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y pigmentos antocianinos.

El método fue realizado empleando una dilución en solución tampón de fosfato 75mM (pH 7,4) con volumen final de 600 μ L. En una micro celda (1mL) fluorimétrica se mezcló el antioxidante (60 μ L) con fluoresceína (360mL; concentración final: 70nM) preincubados durante 15 minutos a 37°C. Se añadió solución de ácido ascórbico PH (180 μ L; concentración final: 12mM). Finalmente se midió la fluorescencia con una λ de excitación de 485nm y de emisión de 520nm, cada 5 minutos durante 80 minutos o hasta una disminución correspondiente a 0-5% del valor inicial. El blanco (FL + ácido ascórbico PH) en tampón fosfato y la curva estándar de Trolox (concentración final: 1-8 μ M) fueron sometidos al mismo proceso. Todas las determinaciones fueron realizadas en duplicado, y se llevaron a cabo tres ensayos independientes para cada muestra. La capacidad antioxidante fue calculada por la diferencia del área bajo la curva de disminución de la fluorescencia, de la muestra en relación al blanco, expresada en equivalentes de Trolox (μ M/g). Se trabajó con diluciones de 0,1 a 1,0:100.

Las muestras de pulpa de fruta congelada, 100% naturales, fueran colectadas al azar, en embalajes de 100g, cosecha 2003/2004 y conservadas a -15°C . La figura 24 muestra la relación obtenida entre la fluorescencia relativa al blanco y el tiempo de reacción para cada pulpa analizada.

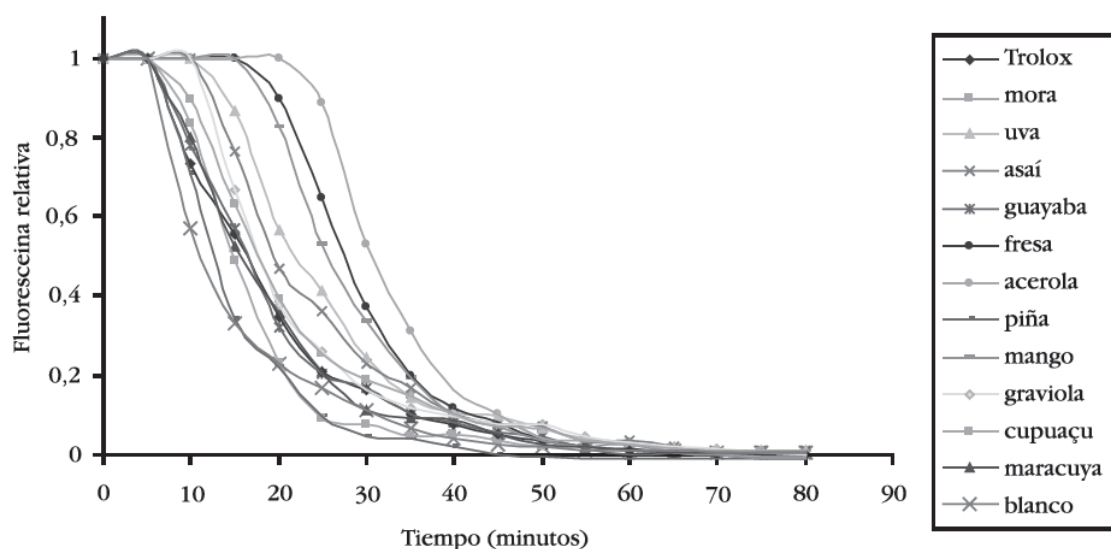


Figura 24 Fluorescencia relativa al blanco, de Trolox y de las muestras de pulpas congeladas.

Fuente: (Kuskoski E. M., Asuero, Troncoso, & Fett, 2006)

El mayor más alto equivalente a $147,9 \mu\text{mol}$ de trolox por gramo de pulpa, corresponde a acerola y el menor valor $6, \mu\text{mol TE/g}$ a la pulpa de mora. La media de los mayores valores TEAC es de $147,9$; $59,6$; $19,3$ y $14,1 \mu\text{mol/g}$ correspondientes a los extractos de acerola, fresa, mango y uva, respectivamente. A pesar de que las muestras de acerola, mango y fresa presentan curvas de mayor área, se debe recalcar que las diluciones empleadas para estas muestras fueron 1:1000 (acerola y mango) y 1:200 (fresa), mientras que para el resto de las muestras la dilución fue 1:100.

Los análisis de repetibilidad condujeron a valores de desviación estándar de 0.1 a 1.5, estos valores son menores a 2, es decir al valor normalmente aceptado para la precisión e indican una adecuada repetibilidad del método. El análisis de fenoles estableció una relación lineal entre la capacidad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos totales cuyo factor es ($r^2=0.8942$, $p<0,01$)

Dentro del análisis de varianza se determinó que en un estudio con frutas congeladas puede existir una gran variabilidad en las muestras, en el estado de madurez de la fruta en el período de cosecha, el estado de conservación y tipo de procesamiento. De igual manera las condiciones de almacenamiento pueden alterar la composición química de la fruta, pero se pudo determinar un producto que es ofrecido congelado mantiene gran parte sus propiedades funcionales.

La precisión, exactitud, reproducibilidad y estabilidad en compuestos puros y/o antioxidantes dietéticos comerciales fueron demostradas, y todos exhibieron una respuesta lineal a la concentración.

5.7 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE INGREDIENTES FUNCIONALES ANTIOXIDANTES, DESARROLLADA POR (Jiménez, 2007)

El objetivo del trabajo de Jiménez consistió en determinar la capacidad antioxidante de cereales y productos derivados, a partir de una extracción de compuestos polifenólicos. El proceso de extracción se realizó en dos fases, empleando una primera mezcla de disolventes con un carácter polar y acidificada (metanol/agua 50:50 v/v pH=2) seguida de una mezcla con un carácter más apolar (acetona/agua 70:30 v/v). Las muestras seleccionadas para este trabajo fueron arroz crudo y hervido, harina de trigo, pan, salvado de trigo y salvado de avena.

Para determinar la capacidad antioxidante de estas muestras, se emplearon dos métodos complementarios: el FRAP, que mide la capacidad de reducción de Fe de la muestra, y el DPPH, que determina la capacidad de captación de radicales libres.

Respecto a la cinética, los resultados del DPPH indican que los antioxidantes de la harina de trigo tienen la cinética más rápida (menor tEC50, necesitan menos tiempo para llegar a reducir en un 50% la cantidad inicial de radical, teniendo la concentración adecuada de antioxidante), mientras que la más lenta corresponde al pan en la extracción acuoso-orgánica. El resto de las muestras presentaron valores intermedios de tEC50

A pesar de que fue necesario tomar más muestra de la usual no fue posible obtener resultados medibles al aplicar el método ABTS, lo cual se relaciona con la

escasa capacidad antioxidante de los cereales en comparación con otros alimentos vegetales, en los que se suele aplicar este método y para los que, por tanto, se encontrarían optimizadas sus condiciones.

En lo que se refiere al DPPH, la capacidad antioxidante de estas muestras es escasa, mostrando no solo una elevada EC50, sino también un alto t_{EC50} , lo que resulta en una baja eficiencia antirradicálica.

DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

FRAP (ferric reducing antioxidant power)

Para el ensayo FRAP se empleó 900 μ L del reactivo que contenía TPTZ, $FeCl_3$ y tampón acetato, se mezclaron con 90 μ L de agua destilada y 30 μ L de la muestra o el blanco (los disolventes usados para la extracción). Los valores de absorbancia a 595 nm se tomaron cada 15 s a 37°C, usando un espectrofotómetro Beckman DU-640, equipado con una celda termostatizada.

Para los cálculos del valor FRAP se tomaron las lecturas a los 30 min, dado que a los 4 min, el tiempo que se toma habitualmente, la reacción para formar el complejo Fe-TPTZ aún no ha terminado

DPPH

La capacidad de las muestras para captar radicales libres se midió con el método DPPH para determinar parámetros cinéticos. A 3,9 mL de una solución metabólica de DPPH, ajustada hasta tener una absorbancia de 0,7, se le añaden 0,1 mL del extracto acuoso-orgánico de la muestra. Se midió la

absorbancia a 515 nm hasta que la reacción se estabilizó. El parámetro EC₅₀, que refleja la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH. También se calculó el tiempo necesario para alcanzar la EC₅₀ (tEC₅₀) y la eficiencia antioxidante ($AE = 1/EC_{50} \cdot tEC_{50}$).

Al ser los cereales muestras con una escasa capacidad antioxidante, fue necesario trabajar con diferentes volúmenes de los extractos (0,5 mL – 1,5 mL) con la solución metanólica de DPPH hasta alcanzar un volumen final fijo de 4 mL.

ORAC

A 175 µL de la muestra o el blanco se mezclaron con 120 µL de PBS pH 7,4 75 mM, 205 µL de una solución de ácido ascórbico PH 53 mM y 3 mL de una solución de fluoresceína 48 nM. La fluorescencia se registró hasta que llegó a cero (longitud de onda de excitación 493 nm, longitud de onda de emisión 515 nm) en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS 55, equipado con una celda termostatzada a 37°C.

Los resultados se calcularon usando las diferencias de áreas bajo la curva entre el blanco y la muestra y se expresaron como equivalentes de Trolox.

ABTS a un tiempo fijo

Tras añadir 100 µL de la muestra de Trolox a 3,9 mL de solución diluida de ABTS•+ (10 mL de una solución de persulfato de potasio conteniendo 66

mg en 100 mL de agua destilada mezclada con 38,4 mg de ABTS y agitada toda la noche, tras lo cual la solución se diluye con metanol hasta una absorbancia final de $0,7 \pm 0,02$, las medidas de absorbancia a 658 nm. se tomaron cada 20 sg usando un espectrofotómetro Beckman DU-460.

La reacción se monitorizó durante 6 min. El porcentaje de inhibición de la absorbancia frente al tiempo se representó gráficamente, calculando el área bajo la curva entre 0 y 6 min. Para la calibración se usaron soluciones de Trolox de concentraciones conocidas.

ABTS expresado cinéticamente

El radical catiónico se generó de la misma manera que para aplicar el método ABTS a un tiempo fijo. Una alícuota de metanol (0,1 mL) se añadió a una solución de 3,9 mL of ABTS \bullet •+ (0,044 g/L). Las absorbancias a 515 nm se midieron en un espectrofotómetro Beckman DU-640 hasta que la reacción se estabilizó. Las concentraciones de ABTS \bullet •+ en el medio de reacción se obtuvieron mediante regresión lineal

Para comparar y tener un valor medible de la eficacia de los métodos, también se determinó la capacidad antioxidante de una mezcla de ácido gálico y catequina, como ejemplos de un ácido fenólico y un flavonoide, respectivamente, en agua, metanol/agua (30:70 v/v), metanol/agua (50:50 v/v), metanol/agua acidificado (50:50 v/v pH 2), metanol y acetona/agua (50:50 v/v).

Por otro lado, para determinar el posible efecto en la medida de capacidad antioxidante de compuestos que podrían estar presentes en las extracciones de los alimentos mencionados. Se analizaron mediante FRAP, ABTS, DPPH y ORAC soluciones de los siguientes compuestos: glucosa, pectina y ácido galacturónico como ejemplos de glúcidos; tirosina y triptófano como aminoácidos aromáticos; arginina como aminoácido nitrogenado; cisteína como aminoácido sulfurado; y albúmina como proteína.

Finalmente, se determinó la capacidad antioxidante de soluciones en las que se encontraban presentes tanto los polifenoles anteriormente mencionados disueltos en distintos medios como cada uno de los otros constituyentes de los alimentos, para determinar si el efecto en la capacidad antioxidante de los polifenoles y los otros componentes de los alimentos eran aditivos, o si al mezclarlos aparecían nuevas interacciones.

RESULTADOS

Por lo que se refiere al efecto del disolvente, se puede ver cómo afecta claramente a estos cuatro ensayos de capacidad antioxidante, aunque no lo hace en todos de la misma manera.

El ORAC es el método en el que la influencia del disolvente es mayor: el valor de la mezcla catequina: ácido gálico en agua es un 48% inferior al valor obtenido en acetona/agua (50:50 v/v), valores a su vez diferentes a los de los otros solventes. Esto indica que el valor ORAC es más alto cuanto más apolar es

el solvente o mezcla de solventes empleados. Estos resultados se muestran en la Tabla 18.

También se observó que la presencia de ácido en el disolvente no parece tener una influencia en el ORAC, dado que no hubo diferencias significativas entre los valores de ORAC en metanol/agua (50:50 v/v) y en metanol/agua acidificados (50:50 v/v pH 2)

En el caso del ABTS, el solvente también afectó de manera importante a los resultados; el valor de la mezcla de compuestos polifenólicos fue un 40% inferior en metanol/ agua (50:50 v/v) que en agua. En este caso, el valor de ABTS fue mayor cuanto más polar era el disolvente. También se observó una clara influencia del pH, con un resultado un 61% inferior en metanol/agua acidificados (50:50 v/v) que en metanol/agua (50:50 v/v).

La influencia del disolvente también se pudo ver en el ensayo FRAP, aunque, en general, los valores mostraron menos variaciones entre los distintos disolventes que en el caso del ABTS o el ORAC, salvo en el caso de metanol/agua (30:30 v/v), donde el valor obtenido fue muy superior a todos los demás. Por lo que se refiere a la acidez, como el propio ensayo se desarrolla en un medio ácido (pH 3,6), no hubo diferencias significativas entre el valor obtenido en metanol/agua (50:50 v/v) y el obtenido en el mismo disolvente acidificado.

El DPPH fue el ensayo en el que la influencia del disolvente fue menor; la mayor diferencia en los valores tuvo lugar entre el agua, con un EC50 para la mezcla de polifenoles de 0,067 y la mezcla acetona/agua (50:50 v/v) o el metanol, con valores de 0,083. La acidez del medio no pareció afectar a este método por lo que se refiere al grado de captura del radical para una concentración determinada, pero sí afectó a la cinética; el metanol/agua acidificados (metanol:agua 50:50 v/v pH 2) proporcionó un tEC50 superior al de ningún otro de los disolventes comparados.

Finalmente, se determinó mediante los métodos en discusión la capacidad antioxidante de una mezcla de catequina: ácido gálico (5 μ M: 5 μ M para el método ORAC y 125 μ M: 125 μ M para el resto de métodos) en agua y en acetona: agua (50:50 v/v) añadiendo los constituyentes de los alimentos previamente analizados de manera aislada. El objetivo de estas mediciones era determinar, en el caso del ORAC y el ABTS, si el valor equivalía a la suma de los valores proporcionados por los polifenoles y por los constituyentes de los alimentos de manera aislada, o si se modificaba debido a nuevas interacciones entre los polifenoles y los constituyentes de los alimentos.

En el caso del FRAP y el DPPH, se pretendía determinar si al mezclar estos componentes con una solución de polifenoles, el valor original de la solución de polifenoles se modificaba, a pesar de que la mayoría de los constituyentes de los alimentos analizados no generaron ninguna respuesta cuando se analizaron de manera aislada.

Los resultados del ensayo ORAC para la mezcla de polifenoles y constituyentes de los alimentos en la solución acuosa se muestran en la Figura 25, donde la columna titulada “valor esperado” muestra el valor de la suma de la solución de polifenoles y las soluciones de constituyentes de los alimentos, y la columna titulada “valor real” muestra los resultados de las mezclas conjuntas de polifenoles y constituyentes de los alimentos.

En el caso del ácido galacturónico, la tirosina y el triptófano, los valores experimentales no fueron significativamente diferentes a los esperados. Sin embargo, en el caso de la glucosa, la arginina y la cisteína, que no habían producido valor ORAC por sí mismas, y en el de la albúmina, que había generado un valor muy bajo cuando se analizó sola, dieron lugar a un aumento considerable del valor ORAC cuando se mezclaron con los polifenoles. Esto indica que la existencia de interacciones entre los polifenoles y los constituyentes de los alimentos generan nuevos productos que aportan al valor final en el método ORAC.

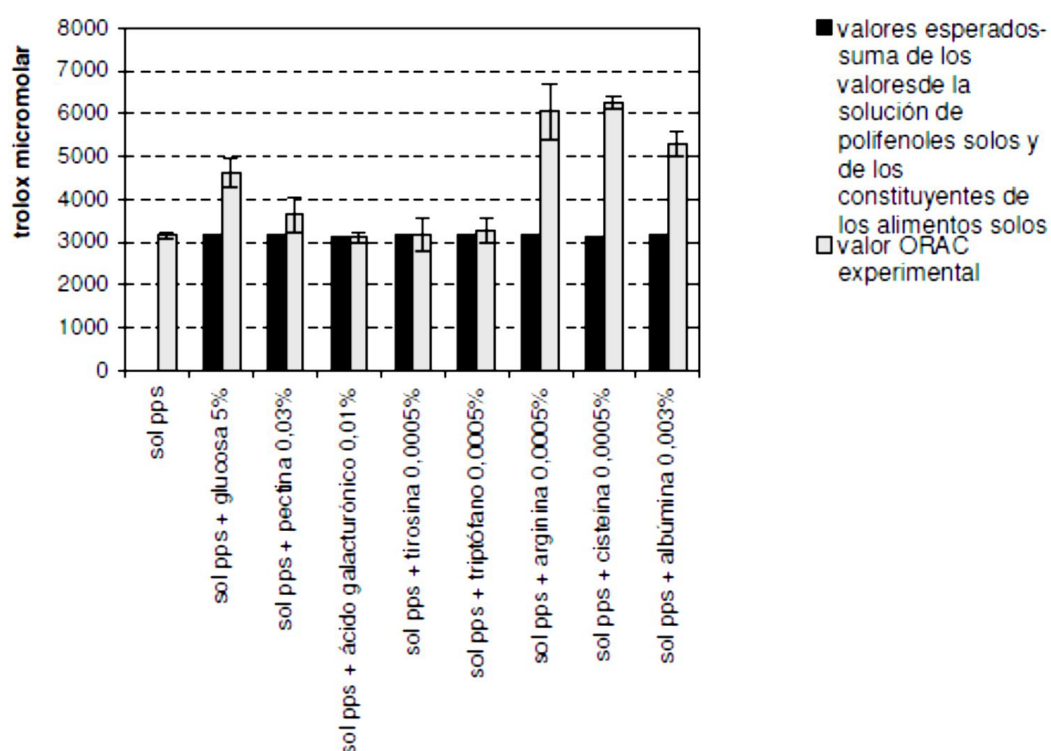


Figura 25 Valores de ORAC esperados y experimentales para una solución acuosa de catequina: ácido gálico 5 μ M: 5 μ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.

Fuente: (Jiménez, 2007)

Los valores de ABTS para las soluciones acuosas de polifenoles y constituyentes de los alimentos se muestran en la Figura 26.

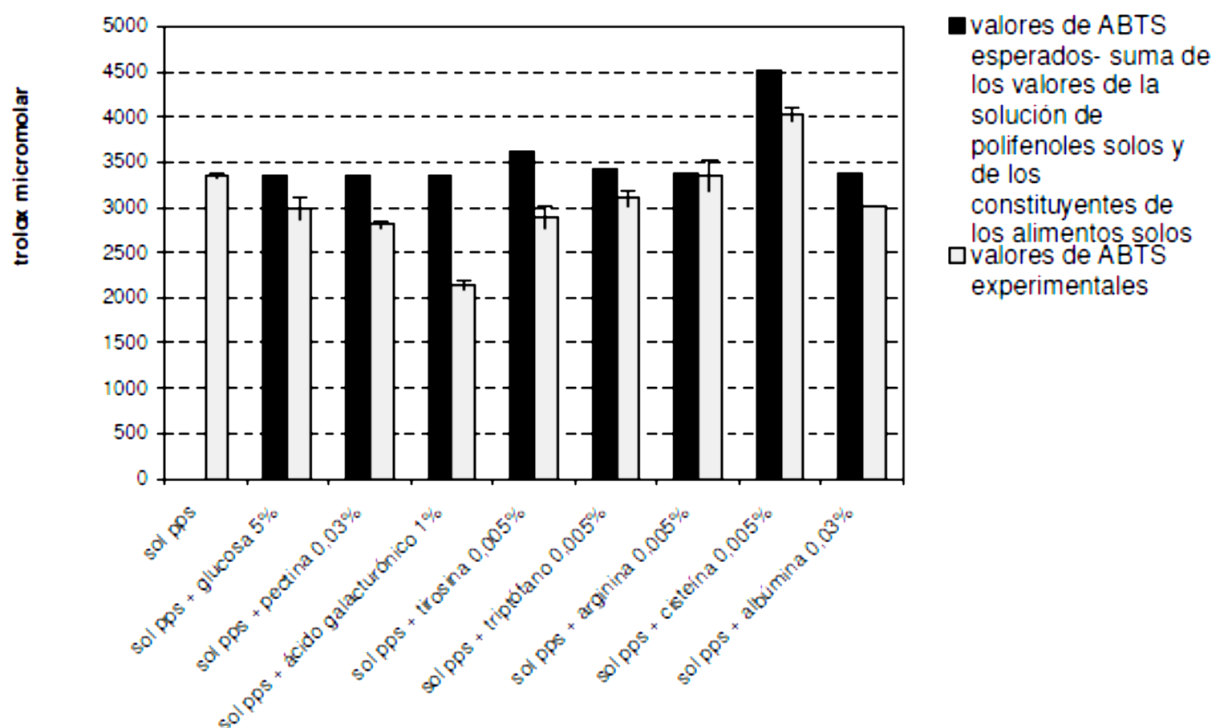


Figura 26 Valores de ABTS esperados y experimentales en agua de una solución de catequina: ácido gálico 125 μ M: 125 μ M (“sol pps”) mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos

Fuente: (Jiménez, 2007)

Todos los constituyentes de los alimentos analizados, salvo la cisteína, redujeron el valor de ABTS respecto al esperado, especialmente el ácido galacturónico, seguido por la pectina y la tirosina, lo cual confirma la aparición de interacciones que afectan a los valores de capacidad antioxidante. Únicamente la solución de arginina proporcionó un valor equivalente al de la solución de polifenoles solos.

6. DIFERENCIAS ENTRE MÉTODOS

6.1 MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS

Los métodos de determinación de actividad antioxidante directos e indirectos, tienen muchos factores que pueden afectar los valores durante el análisis. Estos factores son: matriz, pH de trabajo, tipo, concentración y polaridad de los solventes empleados. La Tabla 18 muestra los valores obtenidos con diferentes concentraciones de solventes y varios métodos de análisis, en la misma muestra, por la investigadora (Jiménez, 2007).

Las diferencias mencionadas producen baja reproducibilidad, repetibilidad, exactitud y precisión en el método, este es el motivo por el cual durante el análisis de actividad antioxidante suele emplearse por lo menos dos métodos diferentes con el fin de confirmar resultados considerando todas las variantes posibles.

Tabla 18 Resultados de los métodos ORAC, ABTS, FRAP y DPPH en una mezcla de catequina: ácido gálico 1M: 1M en distintos disolventes.

Fuente: (Jiménez, 2007)

Disolvente	ORAC H	ABTS	FRAP	DPPH		
	($\mu\text{mol Trolox/g}$)	($\mu\text{mol Trolox/g}$)	($\mu\text{mol Trolox/g}$)	EC50 (g/g)	t EC50 (min)	AE
Metanol	20836,6 + 2079,6	11291,4 + 837	9642,4 + 977,1	0,083 + 0,004	19,72 + 0,73	0,6
Metanol/agua (50:50 v/v)	18284,6 + 1661,5	11148 + 730,3	11149,7 + 565,3	0,080 + 0,002	16,70 + 0,65	0,8
Metanol/agua acidf. (50:50 v/v, pH 2)	19818 + 750,4	6763,9 + 65,6	10934 + 135,1	0,081 + 0,002	28,02 + 2,35	0,4
Metanol/agua (30:70 v/v)	19410,8 + 2068,4	26494,5 + 2011,7	14622,7 + 1095,9	0,076 + 0,001	19,57 + 0,73	0,7
Acetona/agua (50:50 v/v)	30217,5 + 2100,1	13894,8 + 240,2	10100,1 + 489,7	0,083 + 0,003	19,44 + 0,80	0,6
Agua	13543,6 + 298,4	28104 + 275,8	9559,2 + 110,7	0,067 + 0,001	19,73 + 1,45	0,8

La tabla 19 detalla las ventajas y desventajas de los métodos directos e indirectos para la determinación de la capacidad antioxidante en alimentos:

Tabla 19 Ventajas y desventajas de los métodos de determinación de capacidad antioxidante en alimentos.

Fuente: (Lacalle, 2007)

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
ORAC (oxigen radical absorbance capacity)	El uso de una proteína como sustrato impide que el propio sustrato genere radicales libres debido a su oxidación. Sirve para determinar la capacidad de muestras acuosas y hidrofóbicas, si se cambia la fuente generadora de radicales y el disolvente	Algunos reactivos puede interaccionar con polifenoles dando lugar a valores erróneos. El tiempo de la reacción promedio es de 1 hora. El empleo de marcadores fluorescentes aumenta la sensibilidad del método pero se requiere un fluorímetro para la detección.
FRAP (ferric reducing antioxidant power)	El ensayo FRAP es sencillo y fácilmente automatizable. Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos.	La reacción no es específica, cualquier reactivo con potencial Redox puede producir reducción del complejo Fe 3. No todos los antioxidantes donan sus electrones a cualquier electrodo de trabajo seleccionado, por lo que en algunos casos se requiere electrodos específicos.
DMPD (2,5dihydroxy Methyl 3,4-dihydroxy Pyrrolidine)	Los compuestos antioxidantes, son capaces de transferir un átomo de H ⁺ , provocando una decoloración proporcional a su concentración	Sólo puede disolverse en medio acuoso. Requiere un pH de 5,25 para la generación del radical.
DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl Hydrazyl)	Es un método rápido y sencillo, que no requiere de un equipamiento sofisticado. A diferencia del ensayo ABTS (TEAC), no es necesario generar el radical puesto que el DPPH se comercializa.	Sólo puede disolverse en medio orgánico. La interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes/moléculas pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH, como por ejemplo los carotenoides.
ABTS (2,2 azino bis 3 ethylbenzo thiazoline 6-sulfonic)	Soluble en agua y disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical generado químicamente (persulfato potásico), fue validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa económica	Las reacciones por lo general requieren tiempos largos de incubación o altas temperaturas.

A pesar de que todos los métodos mencionados han sido validados por la AOAC. De acuerdo a la norma AOAC SMPR 2011.011, existen ciertos requerimientos de desempeño que estos métodos deben cumplir para ser válidos para la matriz aplicada, los cuales se mencionan en el anexo 2. (Antioxidants, 2012)

6.2 HPLC y ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Los valores obtenidos por Luna (Luna, 2013) y Araujo (Araujo, y otros, 2013) para la validación de los métodos de HPLC y espectrofotometría UV-VIS para la determinación de Vitamina A se incluyen en la tabla 20.

Tabla 20 Datos comparativos entre HPLC y UV-VIS para la determinación de Vitamina A

FACTOR DE MEDICIÓN	VALORES OBTENIDOS		CRITERIO
	UV-VIS	HPLC	
% Recobro	99,70%	98,60%	El porcentaje de recobro debe de estar entre el rango del 80 – 110%.
Exactitud	± 2.2622	$\pm 0,99$	Que no exista diferencia significativa entre las media obtenidas de las dos variables de estudio para un nivel de confianza del 95%
Repetibilidad	4,25	1,37	El porcentaje del coeficiente de variación no debe de superar el 7.3% UV-VIS y para HPLC 1,5%
Precisión intermedia	3,80%	2,70%	El porcentaje del coeficiente de variación no debe de superar el 7.3% UV-VIS y para HPLC el 5%
Linealidad del Sistema	0,99	0,98	El coeficiente de determinación deberá ser mayor 0.98
Límite de Cuantificación	0,345 ppm	0,554 ppm	N/A
Intervalo / Rango	0.35 – 25 ppm	5 - 40 ppm	Debe incluir la concentración inferior y superior del analito, con adecuada precisión, exactitud y linealidad.

Los resultados obtenidos por (Hernández, Aldana, & Rodríguez, 2011), (Odorissi, Mercadante, Domingos, & Viotto, 2012) para la determinación de carotenos, se muestran en la tabla 21.

De los dos cuadros comparativos se puede concluir que la metodología de menos límite de cuantificación, mayor sensibilidad, mayor precisión y exactitud es el método por HPLC.

Tabla 21 Datos comparativos entre HPLC y UV-VIS para la determinación de Carotenos

FACTOR DE MEDICIÓN	VALORES OBTENIDOS		CRITERIO
	UV-VIS	HPLC	
% Recobro	99,70%	102,50%	El porcentaje de recobro debe de estar entre el rango del 80 – 110%.
Repetibilidad	3,40%	7,20%	El porcentaje del coeficiente de variación no debe de superar el 7.3% UV-VIS y para HPLC 1,5%
Linealidad del Sistema	0,99	0,99	El coeficiente de determinación deberá ser mayor 0.98
Límite de Cuantificación	1,28 ppm	0,6 ppm	N/A
Intervalo / Rango	1,41 - 13,42	1,0 - 10,0	Debe incluir la concentración inferior y superior del analito, con adecuada precisión, exactitud y linealidad.
Límite de detección	0,42 ppm	0,2 ppm	N/A

7. CONCLUSIONES

Tras el desarrollo de la presente monografía, se han llegado a establecer las siguientes conclusiones generales:

- Los antioxidantes son elementos que, favorecen la regulación natural del cuerpo para mantener un equilibrio; actúan como captadores de radicales libres, además de que inhiben los efectos dañinos de éstos.
- En la actualidad los antioxidantes y su actividad, son dos de las cualidades más analizadas en productos alimenticios, desde el enfoque de aditivo para la conservación del producto o para determinar la contaminación o calidad del mismo.
- Los antioxidantes, entre los que se cuenta como los más conocidos al Beta-caroteno, las vitaminas A, B, D y E, el selenio y el licopeno, han demostrado ser efectivos como complemento en el tratamiento de diversas patologías relacionadas al estrés oxidativo, así como problemas cardíacos, pancreáticos y cáncer.
- El solvente empleado para la preparación de muestra, los componentes no antioxidantes de los alimentos y el método de medida, afectan de manera significativa los valores de capacidad antioxidante, motivo por el cual durante el análisis de actividad antioxidante suele emplearse por lo menos dos

métodos diferentes con el fin de confirmar resultados considerando todas las variantes posibles.

- De los métodos ensayados (FRAP, ABTS, DPPH, ORAC), el ORAC es el que presenta más variabilidad. Por lo tanto, sólo deberían ser válidas las comparaciones de capacidad antioxidante de alimentos cuando se utilice el mismo solvente de extracción y el mismo método de cuantificación.
- Varios investigadores han demostrado la efectividad tanto de la espectrometría UV-VIS como de la cromatografía líquida. Teniendo las dos técnicas bajos límites de detección, alta sensibilidad, linealidad, exactitud y reproducibilidad.
- A nivel analítico la técnica más recomendada para determinar el contenido de antioxidantes en alimentos, es la cromatografía líquida, por su precisión y repetibilidad. El método permite detectar varias vitaminas al mismo tiempo, además el proceso de preparación de la muestra es más sencillo, lo cual proporciona un resultado más confiable y reproducible.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHA Science Advisory, 1999. [Fecha de consulta: 28 de enero de 2015]
Disponible en: <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/99/4/591>.

Antioxidants, E. R. **Standard Method Performance Requirements for in vitro Determination of Total Antioxidant Activity in Foods, Beverages, Food Ingredients, and Dietary Supplements**, AOAC, Stakeholder panel on strategic Food Analytical Methods, 2012.

Araujo, K., Páez, G., Mármol, Z., Arenas, E., Cáceres, A., & Mazzarri, C. A. **Validación de un método cromatográfico para la determinación de vitamina A en muestras de leche**. F. d. Universidad de Zulia, Ed., 22 de noviembre de 2013 [fecha de consulta: 06 de marzo de 2015] Disponible en: <http://200.35.84.134/index.php/rtcu/article/view/190>.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. D., Ray, S., Kuszyinski, C., & Joshi, S. a. **Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention**. Toxicology, 187, vol 1, 2000.

Bhaskar Banerjee, D. B. **Beneficial Effects of a novel IH 636 grape seed proanthocyanidin extract in the treatment of chronic Pancreatitis**. Digestion, 203, vol 2, 2014.

Blasar, C. **Antioxidant effect of natural bioactive compound Cuar Pham Des**. Cuar Pham Des , 365, 2010.

Brand, W., Cuvelier, R., & Berset, C. **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity**. Technol, 25, 1995.

Bratman, S. NYU Langone Medical Center. **Los antioxidantes y su salud**. [fecha de consulta: 02 de febrero de 2015] Disponible en: <http://www.med.nyu.edu/content?ChunkIID=125815>.

Butnariu, M., & Grozea, L. **Omicsonline, Antioxidant (Antiradical) Compounds. Bioequivalence & Bioavailability**. [Fecha de consulta: 28 de enero de 2015] Disponible en: <http://omicsonline.org/antioxidant-antiradical-compounds-jbb.10000e18.pdf>.

Calvo, M. **Química de los Alimentos**. Universidad de Zaragoza 1991. [Fecha de consulta 10 de febrero de 2015] Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/pigmentos/carotenoides.html>.

Caroteno. Wikipedia. Actualizado 15 de marzo de 2015. [fecha de consulta: 18 de marzo de 2015] Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Caroteno>.

Causse, C, **Los secretos de la salud de los antioxidantes.** Hispano Europea, 2014.

Cintra, R., & Mancinil-Filho, J. **Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo.** Nutrire, 49, 2002.

Criado, C., & Moya, M. **Vitaminas y Antioxidantes.** Actualizaciones. El Médico, 7, 2009.

Cubero, N., Monferrer, A., & Villalta, J. **Aditivos Alimentarios.** Colección tecnológica de alimentos, 2002.

Curso **Formación Técnico en "Laboratorio de Diagnóstico Clínico"**, 2014. [fecha de consulta: 15 de marzo de 2015] Disponible en: <http://elblogdeadepti.blogspot.com/p/resumen-analisis-bioquimico-fundamentos.html>.

Desmarchelier, C., & Ciccia, G. **Antioxidantes de Origen Vegetal.** Ciencia Hoy, 1998.

Espectro Electromagnético, actualizado 03 de marzo de 2015. [fecha de consulta: 18 de marzo de 2015] Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Espectro_electromagn%C3%A9tico.

Espectroscopia Ultravioleta-Visible, actualizado 29 de septiembre de 2014. [fecha de consulta: 18 de marzo de 2015] Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_ultravioleta-visible.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. **Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines.** J. Agric. Food Chem, 1035, 1999.

Furukawa S, F. T. **Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** J. Clin. Invest, 1752-1761, 2004.

Galárraga, D. E. **Química de Alimentos Tomo II.** Ibarra, Ecuador, 2003.

Gilca, M., Stoian, I., & Virgolici, B. **The oxidative hypothesis of sensure.** J. Pstgrad. Med, 207, 2007.

González, A. E.-H. **Papel de los antioxidantes en la promoción de la salud oral.** Cient Dent, 107, 2008.

Gottau, G. **Los alimentos con más carotenos**, actualizado el 14 de mayo de 2012. [fecha de consulta: 18 de marzo de 2015] de Vitónica alimentación, deporte y salud. Disponible en: <http://www.vitonica.com/alimentos-funcionales/los-alimentos-con-mas-carotenos>.

Gutierrez, T. M., Hoyos, O., & Páez, M. I. **Determinación del contenido de ácido ascórbico en uchuva por cromatografía líquida de alta resolución.** Facultad de Ciencias Agropecuarias, vo, 5, N°1, 70-79, 2007.

Hernández, T. P., Aldana, M. I., & Rodríguez, L. I. **Validación de un método para la determinación de beta-caroteno en aceite de palma por HPLC con detector UV.** Bogotá, Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2011.

HPLC Detectors, 2014 [fecha de consulta 19 de marzo de 2015] Wake Forest University. Disponible en: <http://www.wfu.edu/chemistry/courses/jonesbt/334/HPLCdetectors.ppt>.

HUIVH. **Tratamiento natural para regeneración celular**, 2010. [Fecha de consulta: 24 de enero de 2015] Disponible en: <https://recuperesusalud.wordpress.com/about/>.

INEN. **NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN-CODEX 192:2013.** NORMA GENERAL DEL CÓDEX PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS, 2013.

Izquierdo, G., & Cevallos, G. **Efectos de los antioxidantes en el envejecimiento celular.** 2006.

Jiménez, J. P. **Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos.** Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Universidad Autónoma de Madrid, 2007.

Kähkönen, M., Copia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Ija, K. P., & Heinonen, T. S. **Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds.** J. Agric. Food Chem, 3954, 1999.

Kamal, E. **The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols.** Lipids, 671, 1996.

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. **Actividad Antioxidante de Pigmentos Antiociánicos**. Food Science and Technology, Campinas, Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim, 691, 2004.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., & Fett, R. **Capacidad antioxidante ORACfl de pulpas de frutos congelados**. Nutrire: Revista da sociedade brasileira de alimentação e nutrição, vol 31, N°1, 53-64, 2006.
- Kwiterovich, P. **The effect of dietary fat, antioxidants and pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins and atherosclerosis**. J Am Diet Assoc , 531, 1997.
- Lacalle, A. **Antioxidantes en alimentación: diferentes formas de expresar su actividad** antioxidante. Tipos de unidades y métodos de análisis. 2007 [fecha de consulta: 06 de marzo de 2015] Disponible en: <http://www.anme.com.mx/libros/Antioxidantes%20en%20alimentaci%F3n.pdf>
- Licopeno**, actualizado 20 de Enero de 2015. Wikipedia [fecha de consulta: 03 de marzo de 2015] Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Licopeno>.
- Lista de los aditivos permitidos actualmente en la Unión Europea**. (2010). [fecha de consulta 26 de Enero de 2015] Disponible en: http://histolii.ugr.es/euroe/e_index.htm.
- Luna, N. **Validación del método de cuantificación de vitamina A (retinol) en azúcar moreno por espectrofotometría ultravioleta / visible**. El Salvador: Universidad de El Salvador- Facultad de Química Farmacia. 2013.
- Medina, L. A. **Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos**. Autodidacta. 2010.
- Mesa-Vanegas, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez-Vega, J., Trujillo, S. B., & Rojano, B. **Actividad Antioxidante y Contenido de Fenoles Totales de Algunas Especies del Género Calophyllum**. Escuela de Química, Laboratorio de Ciencias de los Alimentos. Medellín: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 2009.
- Meyer, F., Galon, P., Douville, P., & al., e. **Antioxidant vitamin and mineral supplementation and prostate cancer prevention**. Int J Cancer , 182. 2007.

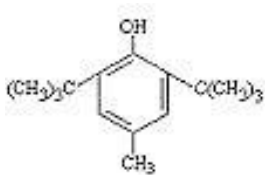
- Min Hu, D., & Decker, J. M. **Antioxidant activity of a proanthocyanidin – rich extract from grape seed in Whey Protein isolate stabilized algae oil-in-water emulsions.** J. Agric. Food. Chem, 5272, 2004.
- Moure:, D. F. **Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales** . Santiago de Compostela: Gráficas Garabal, S.L., 2010.
- Murgio, D. A. Estrés Oxidativo, Radicales Libres y Ejercicio. 2005. [fecha de consulta 10 de febrero de 2015] Disponible en: yocorroyvos.com.ar/NUTRICION/estres%20oxidativo.PDF.
- Musil, F., Zadák, Z., & Solichová, D. **Dynamics of antioxidants in patients with acute pancreatitis and in patients operated for colorectal cancer: a clinical study.** Nutrition, 118, 2005.
- Norman, H., Butrum, R., & Feldman, E. **The role of dietary supplements during cancer therapy.** J Nutr, 3794, 2003.
- Odorissi, A. A., Mercadante, A. Z., Domingos, L. D., & Viotto, W. H. **Desarrollo y validación del método espectrofotométrico.** Química Nova, 35(10), 2057-2062, 2012.
- Oliveira, D. **El espectro electromagnético**, actualizado 04 de julio de 2009, Wikimedia Commons.[fecha de consulta: 18 de marzo de 2015] Disponible en: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/10/Espectro_Electromagn%C3%A9tico.JPG.
- Ornelas, E. A. **Química de los Alimentos.** 2011 [fecha de consulta 21 de enero de 2015] Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos90/la-quimica-alimentos/la-quimica-alimentos3.shtml#ixzz3StZziqb5>.
- Palomo, G., Fuentes, E. C., & Moore, R. **Actividad antioxidante, hipolipemiente y antiplaquetaria del tomate (Solanum lycopersicum L.) y el efecto de su procesamiento y almacenaje.** Rev. Chilena de Nutrición. 2010.
- Perez, G., 2014. **Química del ácido ascórbico.** Acidoascorbico.com [fecha de consulta: 18 de marzo de 2015] Disponible en: http://www.acidoascorbico.com/qumica_del_cido_ascrbico.
- Pérez, J. M., **Cromatografía líquida de alta eficacia.** E.C. Clin, Educación continuada en el laboratorio clínico, 8, 49-62, 2005.

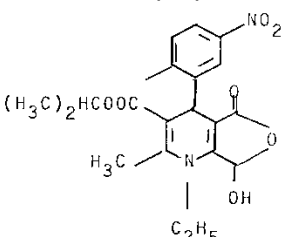
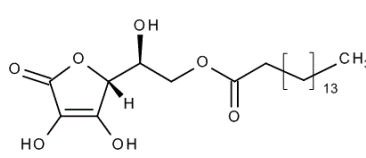
- Ramírez, J., García, C. F., Vizcaíno, J., Cárdenas, J., Gutiérrez, F. J., Mariel, H., & Villagrán, S. **¿Qué son y para qué sirven los antioxidantes?** Revista de Divulgación Científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana, 1, 2012.
- Ruidavets, J.-B., Teissedre, P.-L., Ferrières, J., Carando, S., Bougard, G., & Cabanis, J.-C. **(Catechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine?** Artherosclerosis, 107-117, 2000.
- Saleem, S. Z. 2008. [Fecha de consulta: 17 de febrero de 2015] Disponible en: <http://stroke.ahajournals.org/content/39/12/3389.full>.
- Sanz, A., & RK., S. **The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view.** *Current Aging Science*, vol 1, N°1, 10-21, 2008.
- Seema Bhagwat, D. B. Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Obtenido de . [Fecha de consulta 2 de marzo de 2015] Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/sp2userfiles/place/12354500/data/orac/orac07>.
- Tarrio, F. R. **Tratado de Cuidados intensivos pediátricos.** Madrid: Ediciones Norma-Capitel. 2003.
- Técnicas de separación para la determinación de pesticidas en frutas y verduras**, 22 de Mayo de 2010. [Fecha de consulta: 15 de enero de 2015] Disponible en: <http://trabajo-analisis-quimico.blogspot.com/2010/05/tarea-4-tecnicas-de-separacion-para-la.html>.
- Tocoferoles**, actualizado 05 de septiembre de 2014. Wikipedia. [fecha de consulta: 08 de 03 de 2015] Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Tocoferol>.
- Universidad de Cantabria. Biotecnología. **¿Qué son los radicales Libres?** 2014. [fecha de consulta: 17 de febrero de 2015] Disponible en: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-7.-dano-oxidativo-y-envejecimiento/7.3-bfque-son-los-radicales-libres>.
- Vitale, A. A., Bernatene, E. A., & Pomilio, A. B.. **Carotenoides en quimioprevención: Licopeno.** 2010. [fecha de consulta: 18 de marzo de 2015] Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v44n2/v44n2a05.pdf>.
- Zhang, Z., & Farthing, M. **The roles of vitamin C in Helicobacter pylori associated gastric carcinogenesis.** Chinese J Digest Diseases, 53-58, 2005.

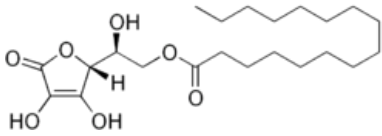
9. ANEXOS

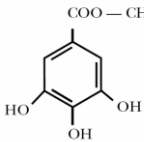
Anexo 1 Aditivos permitidos actualmente en Ecuador

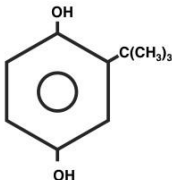
Fuente: (INEN, 2013)

CÓDIGO	ANTIOXIDANTES	ALIMENTOS
SIN 300	Ácido ascórbico	Zumos de frutas, concentrados para jugos de frutas, néctares de frutas, concentrados de néctares de frutas.
SIN 301	Ascorbato de sodio	Zumos de frutas, concentrados para jugos de frutas, néctares de frutas, concentrados de néctares de frutas.
SIN 302	Ascorbato de calcio	Zumos de frutas, concentrados para jugos de frutas, néctares de frutas, concentrados de néctares de frutas.
SIN 303	Ascorbato de potasio	Zumos de frutas, concentrados para jugos de frutas, néctares de frutas, concentrados de néctares de frutas.
SIN 330	Ácido Cítrico	Queso de proteínas del suero, aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra.
SIN 320	Butilhidroxianisol (BHA)	Blanqueadores de bebidas, leche en polvo y nata (crema) en polvo (naturales), aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra, grasas y aceites vegetales.
SIN 321	Butilhidroxitolueno (BHT) 	Blanqueadores de bebidas, leche en polvo y nata (crema) en polvo (naturales), aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra, grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, emulsiones grasas, principalmente del tipo agua en aceites, incluidos los productos a base de emulsiones grasas mezclados y/o aromatizados, postres a base de grasas, excluidos los postres lácteos de la categoría de alimentos 01.7, hielos comestibles, incluidos los sorbetes, hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas, nueces y semillas desecadas.
SIN 484	Citrato de estearilo	Grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, goma de mascar, bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas.

SIN 384	<p>Citratos de isopropilo</p>  <p>The structure shows a central carbon atom bonded to a hydrogen atom, a methyl group (H₃C), a nitro group (NO₂), and a carboxylate group ((H₃C)₂HC(=O)OOC). The carboxylate group is further substituted with a methyl group (H₃C) and an ethyl group (C₂H₅).</p>	<p>Grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, goma de mascar, bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas.</p>
SIN 512	<p>Cloruro estañoso</p>	<p>Frutas en conserva, enlatadas o en frascos (pasteurizadas), hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera) y algas marinas en conserva, en latas o frascos (pasteurizadas) o en bolsas de esterilización, bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas.</p>
SIN 304	<p>Palmitato de ascorbilo</p>  <p>The structure shows an ascorbic acid molecule (a five-membered lactone ring with two hydroxyl groups) esterified with a palmitic acid chain (a long hydrocarbon chain with a terminal methyl group, CH₃, and a subscript 13 indicating the number of methylene groups).</p>	<p>Blanqueadores de bebidas, leche en polvo y nata (crema) en polvo (naturales), productos análogos a la leche y la nata (crema) en polvo, queso madurado, incluida la corteza, postres lácteos (como pudines, yogur aromatizado o con fruta), aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra, grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, emulsiones grasas, principalmente del tipo agua en aceite, incluidos los productos a base de emulsiones grasas mezclados y/o aromatizados, postres a base de grasas, excluidos los postres lácteos de la categoría de alimentos 01.7, hielos comestibles, incluidos los sorbetes, frutas desecadas, postres a base de fruta, incluidos los postres a base de agua con aromas de fruta, hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas y nueces y semillas desecadas, confitería, cereales para el desayuno, incluidos los copos de avena, pastas y fideos pre-cocidos y productos análogos, postres a base de cereales y almidón (p. ej., pudines de arroz, pudines de mandioca).</p>

SIN 305	<p>Estearato de ascorbilo</p> 	<p>Blanqueadores de bebidas, leche en polvo y nata (crema) en polvo (naturales), productos análogos a la leche y la nata (crema) en polvo, queso madurado, incluida la corteza, postres lácteos (como pudines, yogur aromatizado o con fruta), aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra, grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, emulsiones grasas, principalmente del tipo agua en aceite, incluidos los productos a base de emulsiones grasas mezclados y/o aromatizados, postres a base de grasas, excluidos los postres lácteos de la categoría de alimentos 01.7, hielos comestibles, incluidos los sorbetes, frutas desecadas, postres a base de fruta, incluidos los postres a base de agua con aromas de fruta, hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas y nueces y semillas desecadas, confitería, cereales para el desayuno, incluidos los copos de avena, pastas y fideos pre-cocidos y productos análogos, postres a base de cereales y almidón (p. ej., pudines de arroz, pudines de mandioca).</p>
SIN 385	<p>Etilendiaminotetracetato calcio disodio</p>	<p>Grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, frutas desecadas, frutas en vinagre, aceite o salmuera, confituras, jaleas, mermeladas, productos para untar a base de fruta (p. ej., el "chutney"), excluidos los productos de la categoría de alimentos 04.1.2.5, productos de fruta fermentada, hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas, nueces y semillas congeladas, purés y preparados para untar elaborados con hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas, nueces y semillas (p. ej., la mantequilla de maní (cacahuete)), pulpas y preparados de hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas, nueces y semillas.</p>

SIN 386	<p>Etilendiaminotetracetato cálcico disódico</p>	<p>Grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, frutas desecadas, frutas en vinagre, aceite o salmuera, confituras, jaleas, mermeladas, productos para untar a base de fruta (p. ej., el “chutney”), excluidos los productos de la categoría de alimentos 04.1.2.5, productos de fruta fermentada, hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas y nueces y semillas congeladas, purés y preparados para untar elaborados con hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas, nueces y semillas (p. ej., la mantequilla de maní (cacahuete)), pulpas y preparados de hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas y nueces y semillas.</p>
SIN 341	<p>Fosfato diácido de calcio</p> $\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{OH} \end{array} \right]_2 \left[\text{Ca}^{2+} \right]$	<p>Leche y suero de mantequilla (naturales), bebidas lácteas, aromatizadas y/o fermentadas (p ej, leche con chocolate, cacao, ponche de huevo, yogur para beber, bebidas a base de suero), productos lácteos fermentados y cuajados (naturales), (bebidas lácteas), leche condensada (natural), blanqueadores de bebidas , nata (crema) (natural) y productos análogos, leche en polvo y nata (crema) en polvo (naturales), productos análogos a la leche y la nata (crema) en polvo , queso no madurado, queso elaborado , productos análogos al queso, postres lácteos (como pudines, yogur aromatizado o con fruta), suero líquido y productos a base de suero líquido, excluidos los quesos de suero.</p>
SIN 310	<p>Galato de propilo</p> $\text{COO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ 	<p>Leche en polvo y nata (crema) en polvo (naturales), postres lácteos (como pudines, yogur aromatizado o con fruta), aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra, grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, emulsiones grasas, principalmente del tipo agua en aceite, incluidos los productos a base de emulsiones grasas mezclados y/o aromatizados.</p>
SIN 314	<p>Resina de guayaco</p>	<p>Grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, goma de mascar, bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas, goma de mascar, salsas y productos análogos.</p>

SIN 220-228 / 539	<p>Sulfitos</p> $\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{S}-\text{O} \end{array} \right]^{2-} \left[\text{R}^+ \right]_2$	Preparados a base de fruta, incluida la pulpa, los purés, los revestimientos de fruta y la leche de coco, frutas frescas tratadas en la superficie, frutas congeladas, confituras, jaleas, mermeladas, frutas en vinagre, aceite o salmuera, hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas, nueces y semillas frescas peladas, cortadas o desmenuzadas, productos a base de hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera) y algas marinas fermentadas, excluidos los productos fermentados de soja de las categorías 06.8.6, 06.8.7, 12.9.1, 12.9.2.1 y 12.9.2.3.
SIN 334	Ácido tartárico	Zumos (jugos) de frutas, concentrados para zumos (jugos) de frutas, néctares de frutas, concentrados para néctares de frutas.
SIN 319	<p>Terbutilhidroquinona (TBHQ)</p> 	Blanqueadores de bebidas, grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, emulsiones grasas, principalmente del tipo agua en aceite, incluidos los productos a base de emulsiones grasas mezclados y/o aromatizados, dulces, incluidos los caramelos duros y blandos, los turrones, etc., distintos de los indicados en las categorías de alimentos 05.1, 05.3 y 05.4.
SIN 388	Ácido tiopropiónico	Grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, pescado, filetes de pescado y productos pesqueros rebozados congelados, incluidos los moluscos, crustáceos y equinodermos, bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas, aperitivos listos para el consumo
SIN 389	Tiodipropionato de dilaurilo	Grasas y aceites vegetales, manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal, grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar, pescado, filetes de pescado y productos pesqueros rebozados congelados, incluidos los moluscos, crustáceos y equinodermos, bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas, aperitivos listos para el consumo.
SIN 307a	Tocoferol, d-alfa-	Aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra, "ghee", grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar.
SIN 307b	Tocoferol concentrado, mezcla	Aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra, "ghee", grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar.

SIN 307c	<p>Tocoferol, dl-alfa-</p> <div data-bbox="395 331 826 432"> </div> <p>alpha-Tocopherol "Vitamin E"</p> <div data-bbox="395 488 826 566"> </div> <p>gamma-Tocopherol</p> <div data-bbox="395 633 826 712"> </div> <p>delta-Tocopherol</p> <div data-bbox="395 779 826 880"> </div> <p>beta-Tocopherol</p>	<p>Aceite de mantequilla (manteca), grasa de leche anhidra, "ghee", grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar.</p> <div data-bbox="850 331 1281 432"> </div> <p>alpha-Tocotrienol</p> <div data-bbox="850 488 1281 566"> </div> <p>gamma-Tocotrienol</p> <div data-bbox="850 633 1281 712"> </div> <p>delta-Tocotrienol</p> <div data-bbox="850 779 1281 880"> </div> <p>beta-Tocotrienol</p>
----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

* SIN.- Sistema Internacional de Numeración

Anexo 2 Aditivos permitidos en la Unión Europea

Fuente: (Lista de los aditivos permitidos actualmente en la Unión Europea, 2010).

1. Ácido ascórbico	11. Galato de propilo
2. Ascorbato sódico	12. Galato de octilo
3. Ascorbato cálcico	13. Galato de dodecilo
4. Ésteres de ácidos grasos del ácido ascórbico	14. Ácido eritórbico
5. Palmitato de ascorbilo	15. Eritorbato sódico
6. Estearato de ascorbilo	16. Terbutilhidroquinona
7. Extracto rico en tocoferoles	17. Butilhidroxianisol
8. Alfa-tocoferol	18. Butilhidroxitoluol
9. Gamma-tocoferol	19. Extracto de romero
10. Delta-tocoferol	20. 4-Hexilresorcinol

Anexo 3 Requerimientos de desempeño de los métodos de determinación directa

Fuente: (Antioxidants, 2012)

REQUERIMIENTOS	UNIDADES	
FACTOR	$\mu\text{mol trolox}/100\text{ g}$	%
Rango Analítico	400–400000	-----
Límite de detección	133	-----
Límite de cuantificación	400	-----
Repetibilidad	400	0,09
	200000	0,03
	400000	0,03
Factor de recuperación	-----	90 - 110
Reproducibilidad	400	0,13
	200000	0,05
	400000	0,04

Aplicación: métodos in vitro para la determinación de actividad antioxidante total (hidrofílica o lipofílica) en alimentos, bebidas, ingredientes y suplementos alimenticios.

Definiciones:

- Actividad Antioxidante: determinación invitro del potencial total de un alimento, bebida, ingrediente o suplemento alimenticio para inhibir o retrasar la oxidación de otro compuesto. La actividad del Trolox será empleada como unidad base de medición para permitir la comparación entre métodos.
- Rango Analítico: rango en el cual se puede cuantificar con un 95% de confianza la actividad antioxidante de una muestra, empleando diferentes concentraciones de la misma.

- Límite de detección: concentración mínima de una sustancia que puede ser medida y reportada con una confianza del 95% de que la actividad antioxidante es mayor a cero y se determina con un análisis de baja concentración en una matriz dada conteniendo el antioxidante analizado.
- Límite de cuantificación: concentración mínima de analito con la cual se puede obtener resultados cuantitativos con 95% de confianza.
- Repetibilidad, precisión: variación existente a pesar del intento de mantener las condiciones constantes, es decir mismo instrumento, mismo operador y durante un mismo período de tiempo. Se expresa como desviación estándar de la repetibilidad o porcentaje de desviación estándar relativa de la repetibilidad.
- Reproducibilidad: desviación estándar o desviación estándar relativa calculada con los valores obtenidos dentro del laboratorio. Se expresa como desviación estándar de la reproducibilidad o porcentaje de desviación estándar relativa de la reproducibilidad.
- Factor de recuperación: la fracción o porcentaje de analito recuperado al finalizar el método.

